

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr.Dr.h.c. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN OBER FAKTOREN, WELCHE DEN ERFOLG
EINER TRINKWASSERSCHUTZIMPFUNG GEGEN HOHNERPOCKEN
BEEINFLUSSEN KÖNNEN



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität

von

Hermann Gerbermann

aus

Everswinkel

München 1974

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen

Fakultät der Universität München



Dekan: Prof. Dr. E. Dahme

Referent: Prof. Dr. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. E. Munz

Tag der Promotion: 22. Februar 1974

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1 Beziehungen zwischen Umweltbedinungen und Impferfolg	3
2.2 Faktoren, die den Impferfolg von seiten des Impflings beeinflussen	3
2.2.1 Gesundheitszustand des Impflings	4
2.2.2 Alter der Impflinge	4
2.2.3 Maternale Immunität	5
2.3 Einflüsse von seiten des Impfstoffes auf den Impferfolg	10
2.3.1 Einfluß von seiten des für die Impfvirusgewinnung benützten Systems auf den Impferfolg	10
2.3.2 Beziehungen zwischen Virulenz von Impfstämmen und ihrer Eignung für die enterale Impfung	12
2.3.3 Impfstoffzusätze	21
2.4 Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg oral eingesetzter Lebendimpfstoffe	22
2.5 Beziehungen zwischen Impfvorgang und Impferfolg	25
2.5.1 Einfluß der Impftechnik	26
2.5.2 Applikationsmodus und Impferfolg	28
2.6 Der Einfluß der Testmethode auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung bei enteralen Impfungen gegen Viruskrankheiten des Geflügels	34
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	43
3.1 Material und Methoden	43
3.1.1 Versuchstiere	43
3.1.2 Zellkulturen	43
3.1.3 Virusstämme	44

	Seite
3.1.4 Virustitrierungen	44
3.1.4.1 In FHE-Kulturen	45
3.1.4.2 Im Brutei	45
3.1.5 Herstellung der Hühnerpockenimpfstoffe	45
3.1.6 Virulenzprüfungen von HP-Impfstoffen	46
3.1.7 Durchführung der Impfungen	46
3.1.8 Herstellung der Testvirussuspensionen	47
3.1.9 Virulenzbestimmung der Testviren	47
3.1.10 Testinfektion der Hühner	48
3.1.11 Bewertung der Wirksamkeitsprüfung	49
3.1.11.1 Nachweis der Hautimmunität	49
3.1.11.2 Nachweis einer zentralen Immunität	50
3.1.11.3 Kombiniertes Nachweis von lokaler und zentraler Immunität	50
3.1.12 Virusnachweis in Organ- bzw. Rachenspülproben	51
3.1.13 Handels-Impfstoffe	52
3.2 Versuche und Ergebnisse	53
3.2.1 Einfluß von Challenge-Virus, -Dosis und -Modus auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpocken-Trinkwasservakzinen	54
3.2.1.1 Einstellung der Testdosis bei den Stämmen HP-1 und Weesp II am Huhn	54
3.2.1.2 Einfluß verschiedener Challenge-Virusstämme auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung	56
3.2.1.3 Einfluß der Testvirusdosis auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung	59
3.2.1.4 Einfluß des Challengemodus auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung	63
3.2.2 Der Einfluß des maternalen Impfstatus auf den Erfolg der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung bei Küken	66

	Seite
3.2.3 Beziehungen zwischen Attenuierungsgrad des Impfvirus, Virulenz für Eintagsküken und Eignung für die Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken	70
3.2.3.1 Prüfung des Impfvirus auf Restvirulenz im Eintagsküken	70
3.2.3.2 Unschädlichkeit des HP-1-Impfvirus der 194. FHE-Passage bei Applikation mit dem Trinkwasser	72
3.2.3.3 Immunogene Wirksamkeit von unterschiedlich stark attenuiertem HP-1-Virus bei der Trinkwasservakzinierung	75
3.2.4 Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Hühnerpocken-Trinkwasservakzinierung mit HP-1-Virus der 194./195.- und 272./273. FHE-Passage	79
3.2.4.1 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 194./195. FHE-Passage	79
3.2.4.2 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 272./273. FHE-Passage im Rahmen eines praxisbezogenen Impfprogrammes	83
3.2.5 Anwendung der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung in der Praxis	88
3.3 Besprechung der Ergebnisse	93
3.4 Zusammenfassung	105
Summary	107
4. LITERATURVERZEICHNIS	109
5. LEBENSLAUF	

	Seite
3.2.3 Beziehungen zwischen Attenuierungsgrad des Impfvirus, Virulenz für Eintagsküken und Eignung für die Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken	70
3.2.3.1 Prüfung des Impfvirus auf Restvirulenz im Eintagsküken	70
3.2.3.2 Unschädlichkeit des HP-1-Impfvirus der 194. FHE-Passage bei Applikation mit dem Trinkwasser	72
3.2.3.3 Immunogene Wirksamkeit von unterschiedlich stark attenuiertem HP-1-Virus bei der Trinkwasservakzinierung	75
3.2.4 Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Hühnerpocken-Trinkwasservakzinierung mit HP-1-Virus der 194./195.- und 272./273. FHE-Passage	79
3.2.4.1 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 194./195. FHE-Passage	79
3.2.4.2 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 272./273. FHE-Passage im Rahmen eines praxisbezogenen Impfprogrammes	83
3.2.5 Anwendung der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung in der Praxis	88
3.3 Besprechung der Ergebnisse	93
3.4 Zusammenfassung	105
Summary	107
4. LITERATURVERZEICHNIS	109
5. LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

In den Jahren 1971 und 1972 haben MAYR und Mitarbeiter nachgewiesen, daß sich Küken und Hühner wirksam und gefahrlos über das Trinkwasser mit vermehrungsfähigem, über Zellkulturpassagen attenuiertem Hühnerpockenvirus immunisieren lassen.

Bei der oralen Impfung beeinflussen in wesentlich stärkerem Maße als bei der parenteralen Vakzination exogene und endogene Faktoren den Erfolg der Vakzinierung. Es ist Aufgabe dieser Arbeit, die Ursache - Wirkungs - Relation der dabei beteiligten Systeme zu untersuchen. Dabei soll gleichzeitig zu den Konsequenzen für die Wirksamkeitsprüfung der Trinkwasservakzination Stellung genommen werden.

2. SCHRIFTTUM

Gegen Pocken ist bisher ausschließlich auf kutanem Wege geimpft worden. Modellversuche am Huhn haben nun bewiesen, daß eine Immunisierung auch auf oralem Wege möglich ist. Obwohl mit diesem Verfahren bisher relativ wenige Erfahrungen gemacht werden konnten, zeichnen sich jedoch einige Bedingungen ab, die den Wert der per os-Vakzinierung gegen Pocken entscheidend bestimmen. Weitere Beziehungen zwischen Impfung, Impferfolg und dessen Nachweis zu untersuchen, war Ziel des experimentellen Teils der vorgelegten Arbeit.

Beim Geflügel wird gegen einige Viruskrankheiten seit Jahren auf enteralem¹Wege geimpft, so gegen Newcastle Disease, gegen Infektiöse Bronchitis, gegen Aviäre Encephalomyelitis sowie auch gegen Infektiöse Laryngotracheitis. Die dabei gewonnenen methodischen Erfahrungen sollten auch der Trinkwasservakzinierung gegen Geflügelpocken zugute kommen. Aufgabe des Literaturstudiums war daher, anhand der genannten Impfung diejenigen Faktoren zusammenzustellen, die den Erfolg einer enteral durchgeführten Immunisierung im positiven wie im negativen Sinne beeinflussen.

Wie bei jeder Vakzinierung wirken dabei folgende drei Systeme zusammen: der Impfling - die Einwirkung der Umwelt - der Impfstoff. Bei der enteralen Impfung tritt hierzu noch der Faktor des Impfvorganges, der bei individueller, parenteraler Applikation meist bedeutungslos ist. Will man den Wert einer Immunisierung objektiv charakterisieren, muß man genaue Kriterien für die Wirksamkeitsprüfung festlegen. Im folgenden werden diese Problemkreise kurz besprochen.

¹ Der Einfachheit halber wird der Ausdruck "enteral" für alle nicht parenteralen Applikations-Methoden benutzt, also nicht nur für orale, stomachale oder kloakale, sondern auch für nasale, intratracheale, okuläre und ähnliche Verabreichungsformen.

2.1 Beziehungen zwischen Umweltbedingungen und Impferfolg

Wie bei jeder Schutzimpfung können auch bei der oralen Impfung Umweltfaktoren wie Ernährung, Klima (Temperatur und Luftfeuchtigkeit), die Art des Zusammenlebens in einem Biotyp (Extensiv- oder Intensivhaltung) und die Zusammensetzung der Mikro- und Makroorganismen das Immunitätsgeschehen positiv oder negativ gestalten (MAYR und BUSCHMANN, 1967; MAYR et al., 1969).

In der Geflügelwirtschaft, die vor allem unter ökonomischen Gesichtspunkten betrieben wird, hat heute nur noch die Intensivhaltung Bedeutung. Der dadurch hervorgerufenen individuellen Streßsituation begegnet man durch optimale Umweltgestaltung. Von dieser Seite aus bestehen also keine Faktoren, die auf die orale Vakzinierung spezifisch einwirken.

2.2 Faktoren, die den Impferfolg von seiten des Impflings beeinflussen

Der Impferfolg ist sehr stark vom Status des Impflings abhängig. Folgende Faktoren vermögen generell das Immunitätsgeschehen zu beeinflussen: Konstitution, Kondition, Alter, Leistung, Geschlecht und die Funktionsfähigkeit der Immunitätsorgane (GILL et al., 1970, 1971).

Von besonderer Bedeutung ist zweifelsohne die Aktivität des Immunsystems eines Impflings. So gibt es ganz grob gesehen gute und schlechte Immunitätsbildner. Auf solche individuellen Schwankungen läßt sich in der Regel bei der heutigen Massentierhaltung nicht eingehen. Hier steht das Kollektiv der zu Impfenden im Vordergrund.

Von seiten des Impflings finden im allgemeinen nur der Gesundheitszustand, das Alter und ein maternal erworbener Immunitätszustand Berücksichtigung.

2.2.1 Gesundheitszustand des Impflings

Krankheiten und schlechter Ernährungszustand vermögen einerseits Impfschäden zu verstärken, andererseits den Impferfolg zu verringern. Bei gesunden Küken beobachteten PROKOFJENA et al. (1959) nach oraler, aerogener oder intranasaler Vakzinierung gegen Newcastle Disease (ND) mit Lebendimpfstoff nur bei 1 Prozent leichte Impfkomplicationen. Dagegen traten bei im Allgemeinbefinden herabgesetzten Tieren zu 8 bis 10 Prozent Verluste auf. KROSLAK und RAJTAR (1964) empfehlen aus gleichen Gründen, erkrankte Tiere und solche mit schlechtem Ernährungszustand nicht innerhalb der ersten Lebenswochen gegen ND mit dem Impfstamm Hertfordshire zu vakzinieren. Den negativen Einfluß von Krankheiten auf die Immunitätsausbildung betonten SEREBRYAKOV et al. (1969) und SATO et al. (1970). Selbst bei subklinischen Infektionen mit *Salmonella pullorum* bzw. bei einer Mykoplasmosen waren nach einer Impfung gegen ND die haemagglutinationshemmenden (HAH) Antikörper im Vergleich zu gesunden Tieren erniedrigt.

2.2.2 Alter der Impflinge

Im Verlauf der Ontogenese tierischer und menschlicher Organismen nimmt die Fähigkeit zu immunologischen Reaktionen zu, um ab einem gewissen Alter wieder geringer zu werden. Von Spezies zu Spezies und von Antigen zu Antigen treten hierbei beträchtliche Unterschiede auf, so daß man nicht generell von einem bestimmten, für Immunitätsvorgänge optimalen Alter sprechen kann (GOOD et PAPERMASTER, 1964; STERZL et SILVERSTEIN, 1967).

Bei Küken stellten EDWARDS et al. (1968) fest, daß eine allmählich sich steigernde Immunkompetenz um die Zeit des Schlüpfens beginnt. Die Autoren nehmen an, daß die Entwicklung dann einsetzt, wenn Zellen der Bursa Fabricii an die Peripherie gelangen. Nach BASSIOUNI (1961)

sollen Küken praktisch erst ab dem 12. Lebenstag fähig sein, nach oraler Verabreichung einer *Salmonella gallinarum*-Suspension eine rasch einsetzende Immunität zu entwickeln. Die Küken hatten nachweislich keine maternalen Antikörper.

Auch bei Pocken des Geflügels wurde eingehend diskutiert (Literatur bei BRAUER, 1961), ab welchem Alter eine Impfung Erfolg hat. Der günstigste Zeitpunkt wird von den meisten Untersuchern mit acht bis zehn Wochen angegeben. Diese Befunde beziehen sich auf die kutane Impfung. MAYR et al. (1971a) konnten dagegen durch Impfungen über das Trinkwasser bereits fünf Tage alte Küken gegen Hühnerpocken aktiv immunisieren. Die Immunitätsquote betrug 40 bis 50 Prozent und ließ sich durch Boosterung im Kükenalter von 3 Wochen auf 80 Prozent erhöhen. Obwohl also in den ersten Lebenstagen die Ausbildung einer Immunität noch nicht optimal ist, bestehen vom Impfling her keine gewichtigen Gründe gegen eine frühzeitige Vakzination. Zumindest bildet sie die Grundlage für spätere Revakzinierungen (MAYR et al., 1971a; 1971b; RAETTIG et GANZE, 1971).

2.2.3 Maternale Immunität

Durch die Übertragung von mütterlichen Antikörpern auf die Nachkommen sind diese während der Neugeborenenphase auf natürliche Weise gegen Infektionen geschützt. Bei Säugern findet dieser "Immun-Transfer" je nach Plazentaverhältnissen intrauterin bzw. über die Kolostrumaufnahme statt. Die Neugeborenen verfügen auf diese Weise über einen humoralen Mechanismus, um Infektionen abzuwehren. Zudem haben Kolostralkörper, die nicht resorbiert werden, im Verdauungstrakt die Funktion, eindringende Krankheitserreger direkt zu neutralisieren - ein Mechanismus, der in den ersten paar Lebenstagen funktioniert. Bei den Vögeln dient der Eidotter zum Transport der Antikörper vom Muttertier auf die Nachkommen. Qualität und Dauer des Immunschutzes hängen unmittelbar vom Immunstatus der Mutter zum Zeitpunkt der Antikörper-Übertragung ab. Beim Geflügel ist dies der Moment der Dotterbildung (SKUTAR et MUNTJANU, 1971). Die Antikörpermengen im Serum

von Küken, aber auch im Eidotter, entspricht in der Regel derjenigen im mütterlichen Serum (JUNGHERR u. TERRELL, 1948; SCHMITTLE u. MILLEN, 1948; SCHMITTLE, 1950; BORNSTEIN et al., 1952a; CHERBY ROGIER, 1966; DORN et al., 1973; SIEGMANN et al., 1974). Die Dauer des passiven Immunschutzes steht beim Küken in direkter Korrelation zur Höhe des Antikörpertiters und kann nach unterschiedlichen Beobachtungen zwischen 2 und 10 Wochen betragen (BRANDLY et al., 1946; LEVINE u. FABRICANT, 1950; BORNSTEIN et al., 1952b; BOSGRA et ROERINK, 1962; SCHNEIDER u. BENGELSDORFF, 1963b; KUDRIJAVCEV et al., 1965; CREANGA et al., 1966; BEARD u. EASTERDAY, 1967b; KREJMER 1969; MATSUKURA, 1970; LANDGRAF u. VIELITZ, 1972; KALETA, 1972).

Ebenso wie die maternal erworbene Immunität die Neugeborenen vor Infektionen schützt, kann sie den Erfolg einer aktiven Schutzimpfung dadurch verhindern, daß das Impfantigen im Serum bzw. - bei Kolostrumaufnahme - lokal im Darmtrakt neutralisiert wird. Dieser Tatsache muß bei der Immunisierung von Jungtieren Rechnung getragen werden.

Durch enterales Eindringen der Infektionserreger bzw. enterales Vakzinieren wird die Schutz- bzw. Hemmfunktion der maternalen Antikörper nach den bisherigen Erfahrungen jedoch umgangen. BORNSTEIN et al. (1952b) und BEARD u. EASTERDAY (1967b) haben dies für die ND- und IB-Infektion experimentell nachgewiesen. Diese Empfänglichkeit passiv immuner Küken gegen Infektionen auf enteralem Wege läßt erwarten, daß auch eine aerogene oder orale Vakzination bei jungen Küken möglich ist, die maternale Antikörper besitzen (SCHNEIDER und BENGELSDORFF, 1963b).

Von den bei diesem Phänomen wirksamen Vorgängen sind wohl die lokalen Immunprozesse von größter Bedeutung. Besonders in den Schleimhautregionen entstehen auf lokalen Antigenreiz hin Antikörper vom IgA-Typ und tragen zur lokalen Infektionsabwehr bei (TYRRELL, 1969). Immunkompetente Zellen existieren selbst in der Mukosa des Darmtraktes (WERNER et al., 1971).

Die Möglichkeit, trotz maternalen Antikörper über eine lokale Impfung wirksam zu immunisieren, erklärt MONREAL (1971) folgendermaßen: Maternale Antikörper bewirken zwar neben einer humoralen Immunität

im beschränkten Maße auch einen örtlichen Schutz. Letzteren ist aber schwach, da primär keine zelluläre Immunität vorliegt. In solchen Fällen kann dann eine enterale Infektion - wie auch eine Impfung mit lebenden Erregern - lokal haften.

Der klinische Infektionsverlauf (Impfreaktion) kann dann durch die humoralen maternalen Antikörper günstig beeinflusst werden (WITCHNER und WHITE, 1955; BENIGLSDORFF und SCHNEIDER, 1964a; FRITSCHE et al., 1969; BENIGLSDORFF, 1971). Die parenterale Impfung dagegen wird durch den oben erwähnten Neutralisationseffekt wirkungslos (BEAUBETTE und BIVIAN, 1963; ZUFFA und SKODA, 1968; BANKOWSKI et al., 1966; KUDRIJAYCEV et al., 1965; BOX, 1965).

Küken mit maternalen ND-Antikörpern ließen sich *i n t r a n a s a l* mit Erfolg gegen Newcastle Disease immunisieren (WITCHNER, 1962; BEAUBETTE und BIVIAN, 1963; ZUFFA und SKODA, 1968; SAKAR, 1966b; KREJMER, 1969). Möglicherweise ist ein bestimmtes Alter die Voraussetzung hierfür, wie Versuche von WHITE et al. (1953) und BANKOWSKI et al. (1958) an Küken in den ersten Lebenstagen zeigten. Untersuchungen von DOLL et al. (1960), RAGGI et LEE (1958) und HIGGINS (1971) bewiesen dagegen, daß die nasale ND-Impfung den natürlichen, maternal erworbenen Immunschutz verringern kann.

Die Wirkung einer *S p r a y* - oder *A e r o s o l* - Vakzination gegen ND bei vorliegenden maternalen Antikörpern wird von WYNORADNYK et al. (1962), SRIN et al. (1958), KUDRIJAYCEV et al. (1965) und BEARD u. EASTERDAY (1967b) positiv beurteilt. SUGIMURA et al., (1971) konnten sogar einen Antikörperanstieg nachweisen. Bei künstlich passiv immunisierten Tieren (Gabe von ND-Immuns Serum oder einer Gammaglobulin-Fraktion des Immuns Serums) ließ sich nach einer Impfung per Aerosol im Vergleich zur okulären, intranasalen oder intramuskulären Vakzination die beste aktive Antikörperbildung induzieren (BEARD u. EASTERDAY, 1967b). Auf eine aktive *i n t r a - k o n j u n k t i v a l e* Immunisierung gegen ND haben maternale Antikörper nach MARKHAM et al. (1951), ZUFFA u. SKODA (1968) und WYNORADNYK et al. (1962) keinen Einfluß. Dagegen soll eine wirkungsvolle Immunisierung in diesen Fällen nach WHITE et al. (1953) sowie DOLL et al. (1950) nicht möglich sein.

Die o r a l e Applikation von ND-Vakzinen über das Trinkwasser an Tiere mit maternalen Antikörpern erbrachte ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Eine gute bzw. befriedigende Antikörperstimulierung beobachteten ZUFFA u. SKODA (1958), SCHNEIDER und BENGELSDORFF (1963b), CAPORALE et al. (1963), SOKKAR (1966b) und SKUTAR u. MUNTJANU (1971). Nach KREJMER (1969) hemmt der maternale Schutz zwar die aktive Entwicklung von Antikörpern, aber die Tiere sind gegen die Testinfektion am 28. Lebenstag geschützt, wenn eine Trinkwasserimpfung im Alter von 5 Tagen durchgeführt wurde. WINTERFIELD et al. (1957d) und WINTERFIELD und SEADALE (1957c); ebenso JUNGHERR und MARKHAM (1961) beobachteten dagegen eine unregelmäßige und wenig zufriedenstellende Immunantwort nach oraler Vakzination im Zeitraum der maternalen Immunität. Einen ND-Ausbruch führten DUEE und MOINE (1964) darauf zurück, daß eine zu frühe Trinkwasservakzination im Alter von 5 Tagen infolge maternaler Antikörper zu einer unbefriedigenden Immunitätsentwicklung führte. Eine Schutzquote von nur 28 Prozent bzw. 18 Prozent serologisch positive Reagenten erzielten DARDIRI et al. (1957) nach oraler Vakzinierung von 5 Tage alten Küken.

Eine i n t r a n a s a l e Impfung gegen Infektiöse Bronchitis (IB) schützte 2 Tage alte Küken mit maternalen Antikörpern nach RAGGI und LEE (1958) ebenso anhaltend wie Küken, die erst im Alter von 2 Monaten vakziniert worden waren. Auch die o r a l e Impfung 6 Tage alter Küken mit starker passiver Immunität führte zu einem ausreichenden Schutz (RAGGI, 1961). KRAUSS (1963) empfiehlt wegen des Einflusses, den die passive maternale Immunität auf eine Immunantwort nach aktiver Immunisierung ausübt, die erste Vakzination gegen IB im Alter von 3 Wochen und nur in gefährdeten Betrieben im Alter von 4 Tagen durchzuführen. Bei jungen Küken mit hohem maternalen Antikörperspiegel tritt nach S p r a y - oder T r i n k - w a s s e r v a k z i n a t i o n eine Verzögerung in der aktiven Immunitätsentwicklung ein (van der HEIDE et al., 1967). Nur ein Impfverfahren, bei dem der Schnabel der Tiere direkt in flüssige Vakzine eingetaucht wurde, ließ einen ausreichenden Schutz entwickeln.

Den Einfluß des Alters und der maternalen Antikörper auf die aktive Immunitätsentwicklung nach oraler Vakzinierung gegen Aviäre Encephalomyelitis untersuchten CALNEK et al. (1961). Es wurden Impfungen bei Küken im Alter von 4 Tagen, 4, 6, 8 und 10 Wochen vorgenommen. Die Autoren empfehlen, eine Vakzinierung erst ab einem Alter von 10 Wochen vorzunehmen, um eine Interferenz zwischen maternalen Antikörpern und aktiven Immunitätsvorgängen zu vermeiden. Den schnellsten Impferfolg beobachteten sie bei 16 bis 19 Wochen alten Tieren. DORN und SCHINDLER (1970) zeigten, daß eine Vakzinierung bei Tieren mit maternalen Antikörpern im Alter von 5 bis 7 Wochen möglich, mit 10 Wochen aber am günstigsten ist, und daß mit 16 bis 19 Wochen zwar die schnellste Immunantwort eintritt, aber der Zeitraum bis zur Legereife dann zu kurz ist.

Der Einfluß maternaler Antikörper auf den Erfolg einer oralen Hühnerpocken-Schutzimpfung ist noch nicht untersucht worden. Aus Versuchen von BOSGRA und ROERINK (1962) weiß man jedoch, daß bei den Hühnerpocken mütterliche Antikörper auf das Küken übergehen. Sie lassen sich noch ca. 3 bis 4 Wochen nach dem Schlupf im Neutralisationstest nachweisen. Werden Küken mit maternalen Antikörpern im Alter von 3 Wochen geimpft, wird zwar die Stärke der Impfreaktion (Follikelimpfung), nicht aber der durch Challenge nachgewiesene Impferfolg beeinflußt.

Es ist sehr schwer, aus den genannten, recht heterogenen Untersuchungen herauszulesen, ob maternale Antikörper im Küken enterale Impfungen positiv oder negativ beeinflussen. Einige Beziehungen lassen sich aber aufstellen:

Die Unschädlichkeit der Impfungen wird durch einen maternalen Immunschutz positiv beeinflußt. Bei sehr virulenten Impfstoffen wie z.B. gegen IB ist dieser mildernde Effekt sogar erwünscht. Auf der anderen Seite scheint es, daß eine Immunisierung maternal geschützter Küken zwar möglich ist, aber durchaus nicht optimal abläuft. Dies gilt vor allem für die Newcastle Disease. Eine Impfung hat hier mehr Erfolg, wenn sie beim Abklingen des maternal erworbenen Schutzes durchgeführt wird (siehe auch SIEGMANN et al., 1974).

Logische Erwägungen sprechen dafür, daß eine enterale Impfung maternale Antikörper umgeht und daher erfolgreicher ist als eine parenterale Vakzinierung. Experimentell ist diese Hypothese bei den

Impfungen des Geflügels aber noch nicht bewiesen worden.

2.3 Einflüsse von seiten des Impfstoffes auf den Impferfolg

2.3.1 Einfluß von seiten des für die Impfvirusgewinnung benutzten Systems auf den Impferfolg

Für die Gewinnung von Impfstoffen gegen Viruskrankheiten stehen verschiedene Systeme zur Verfügung. Eine Virusproduktion ist möglich im homologen Wirt oder im Versuchstier, im bebrüteten Hühnerei, in homologen und heterologen Zellkulturen.

Für die Herstellung von Vakzinen gegen Geflügelkrankheiten bieten sich Brutei und Zellkulturen aus Hühnerembryonen an, da die Geflügelviren eine natürliche Affinität zu diesen homologen Systemen besitzen. Dazu kommt die leichte und relativ billige Handhabung, besonders beim Brutei. Allerdings besteht hierbei immer die Gefahr, daß Fremdviren über den Hühnerembryo in den Impfstoff gelangen. Es wurde deshalb stets angestrebt, die Impfvirusstämme in heterologen Zellkulturen aus Säugetiergewebe zu vermehren.

Das Newcastle Disease - Virus läßt sich z.B. in den verschiedenen Säugetierzellkulturen züchten. Dies ist gelungen in Hela-Zellen (BANKOWSKI et al., 1958; BANKOWSKI und KINJO, 1965), in Nierenkulturen vom Schwein (MAYR, 1961; PETTE, 1961; MEYN und PETTE, 1961; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1963b; TOTH und MARKOVITS, 1964; MARKOVITS, 1965; GALE et al., 1965), vom Rind (HUYGELEN, 1965; MARKOVITS, 1965), in Baby-Hamster-Kidney (21) - Kulturen (FRENCH u. GEORGE, 1965; ROSSI und ACCIARI, 1968). PETTE (1961) und TOTH und MARKOVITS (1964) fanden bei oraler Verabreichung von ND-Impfstoffen, die im Brutei oder in Schweinenierenkulturen hergestellt worden waren, keine Unterschiede in der Immunitätsbildung. Nach MARKOVITS (1965) hatte dagegen ein aus Schweinenierenkulturen gewonnener ND-Impfstoff einen geringeren Virusgehalt

und mußte daher zweimal appliziert werden, um einen Schutz zu erzielen, der der einmaligen Gabe von Brutei-Impfstoff entsprach.

Ober positive Ergebnisse einer Züchtung des infektiösen Bronchitis-Virus in Affennieren-Zellkulturen berichteten FAHEY et CRAWLY (1956). Es gelang ihnen, das Virus in laufenden Kulturpassagen zu halten. Für die Herstellung von Vakzinen eignen sich jedoch besonders das Brutei und Zellkulturen aus aviärem Material (siehe Literatur bei von BÖLOW, 1966, 1966a).

Geflügelpockenviren können in Säugetierzellen nicht zur Vermehrung gebracht werden (siehe MAYR, 1961). Die Herstellung von Geflügel-pocken-Impfstoffen erfolgt generell im Brutei. Die Attenuierung von Hühnerpockenstämmen in Zellkulturen aus Hühnerfibroblasten wies der Pockenimpfstoffherstellung jedoch neue Wege für eine Verbesserung in Richtung Unschädlichkeit (MAYR und KALCHER, 1960; MAYR u. MALICKI, 1966; MAYR et al., 1971a, 1971b).

Faßt man diese Versuchsergebnisse zusammen so erkennt man, daß Vakzinen gegen virusbedingte Geflügelkrankheiten sich einfach und relativ billig über das Brutei herstellen lassen. Vor allem um die Gefahr einer Kontamination mit aviären Fremdviren zu vermeiden, werden manchmal heterologe Zellkulturen zur Virusvermehrung bevorzugt. Grundsätzlich kann man damit ebenso wirksame Vakzinen produzieren. Da das antigene Verhalten des Virus bei allen Vermehrungssystemen dasselbe ist, wird man sich bei der Viruszüchtung nach wirtschaftlichen Gesichtspunkten richten. Von der weiteren Virusaufbereitung (Reinigung, Spaltung, Konzentrierung) wird dann der Wert der fertiggestellten Vakzine abhängen.

Um Virus in heterologen Systemen zu züchten, bedarf es oft mehrerer Adaptationspassagen, in deren Verlauf es zur Abschwächung des Erregers kommen kann. Wenn damit auch die Immunogenität abfällt, sinkt entsprechend der Wert der Vakzine. Der Grund für die schlechtere Wirksamkeit ist dann im Virulenzgrad des Impfvirus zu suchen, nicht aber in dem System, das zur Viruszüchtung benutzt wurde. Werden Impfviren gleicher Virulenz, aber verschiedener Herkunft in ihrer

immunisierenden Wirksamkeit verglichen, resultieren Differenzen meist aus unterschiedlichen quantitativen Gegebenheiten bei der Impfstoffherstellung.

2.3.2 Beziehungen zwischen der Virulenz von Impfstämmen und ihrer Eignung für die enterale Impfung

Bei der parenteralen wie enteralen Impfung mit Lebendvakzinen ist der Virulenzgrad des verwendeten Impfvirusstammes einer der wichtigsten Faktoren, die den Wert oder Unwert einer Impfung beeinflussen. Nur avirulente Stämme oder solche mit sehr geringer Restvirulenz erfüllen die Primärforderung nach Unschädlichkeit. In vielen Fällen ist es jedoch so, daß milde Feldstämme oder künstlich attenuierte Viren nur eine geringe Immunogenität besitzen. Kompromisse zwischen Unschädlichkeit und Immunisierungsvermögen sind häufig notwendig.

Bedingungen für jeden Lebendimpfstoff ist, daß diese beiden Eigenschaften genau geprüft werden. Entsprechend den jeweiligen Gegebenheiten kann dann ein Kriterium für den zulässigen Grad an Restvirulenz festgesetzt werden. Da der Virulenzgrad häufig vom Applikationsmodus abhängt, kommt den Prüfungsmethoden besondere Bedeutung zu. Bei den Impfungen gegen Geflügel-Viruserkrankungen bestehen jeweils andere Vorausbedingungen. Einerseits erfolgt die Vakzinierung mit avirulenten Impfstoffen, andererseits wird bewußt einer Verbreitung von virulenten Impfstämmen benützt. Da ein Vergleich zwischen den einzelnen Impfstoffen nicht möglich ist, werden sie getrennt abgehandelt.

Die klassische Einteilung der Newcastle Disease (ND)-Virusstämme beruht auf ihrer unterschiedlichen Virulenz. Als Maß gilt das Verhalten nach intracerebraler Infizierung von Eintagsküken. Je nach dem "neuropathischen Index" spricht man von velogenen, mesogenen und lentogenen Virusstämmen (HANSON, 1956). Für Impfungen werden nur

lentogene und bedingt auch mesogene Stämme verwendet.

Als l e n t o g e n gelten die ND-Stämme Hitchner B1, F (Asplin) und LaSota. Ihr neuropathischer Index ist Null (HANSON, 1956; TOTH, 1965; NITZSCHKE und SCHMITTDIEL, 1960; PETTE, 1961). Eine Virulenzsteigerung tritt auch nach fortlaufenden intracerebralen Kükenpassagen nicht auf (GAGLIARDI, 1953).

Von lentogenen ND-Viren wird erwartet, daß sie bei Küken nach oraler Applikation zu keinerlei cerebralen Impfschäden führen. Dagegen können noch, offensichtlich abhängig vom Alter der Impflinge, respiratorische Symptome auftreten. So registrierte HOEKSTRA (1959) nach oraler Impfung 7 Tage alter Tiere mit dem B1 -Virus eine Verlustquote von 3% und bei Verabreichung während der Legeperiode eine über 2 Wochen anhaltende Verminderung der Legeleistung um 10 bis 15 Prozent. Neuere Untersuchungen von LOTHGEN (1971) konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen und stimmen hierin mit einer Vielzahl von Berichten überein, nach denen das Hitchner B1 -Virus für Küken verschiedener Altersstufen absolut unschädlich ist (ZUFFA und SKODA, 1958; BRAN et al., 1958; GORET et al., 1958; FOMINA et al., 1958; GEHRING, 1958; SCHNEIDER, 1960; MEYN und PETTE, 1961; BOSGRA und ROERINK, 1961; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1963a; KROSLAK et al., 1964; JANSSEN und LODERS, 1971; VIELITZ und LANDGRAF, 1971).

Auch bei kombinierter Anwendung mit anderen Virusvakzinen behält der ND-Stamm Hitchner B1 seine gute Verträglichkeit (SCHNEIDER und BENGELSDORFF, 1963a; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1963a; MAYR et al., 1971b). LUGINBUHL et al. (1955) konnten zwar nach kombinierter Impfung 4 Tage alter Küken gegen ND und Infektiöse Bronchitis (IB) milde respiratorische Symptome beobachten, die jedoch auf die IB-Komponente zurückzuführen sein dürften.

Lebendimpfstoffe aus B1-Virus können nicht nur über das Trinkwasser, sondern auch intranasal oder intraokulär appliziert werden. Auch hierbei sind sie für die Impflinge unschädlich (ZUIYDAM, 1953; WINTERFIELD und SEADALE, 1957a).

Auch die lentogenen ND-Stämme F (Asplin) und LaSota können an junge Küken als Trinkwasservakzinen verabreicht werden (BINAGHI et al., 1955; CAPORALE et al., 1963; KROSLAK et al., 1964; VOETEN et al., 1965; LANDGRAF und VIELITZ, 1970, 1972; JANSSEN und LODERS, 1971; VIELITZ und LANDGRAF, 1971). Allenfalls bei Einzeltieren scheint es beim Stamm LaSota zu geringgradigen respiratorischen Störungen zu kommen (WINTERFIELD und SEADALE, 1957a, 1957d; DARDIRI et al., 1957; OBRESKOW et al., 1964). Daher wurde dieser Virusstamm bis vor kurzem als zu virulent angesehen. Die neueren eingehenden Prüfungen von JANSSEN und LODERS (1971) sowie VIELITZ und LANDGRAF (1971) waren maßgeblich daran beteiligt, daß LaSota-Virus jetzt für den Einsatz als Lebendvakzine zugelassen ist.

Mesogene ND-Virusstämme besitzen noch einen gewissen Grad an Restvirulenz. Nach intracerebraler Injektion in Eintagsküken kann ein neuropathischer Index zwischen 0.50 und 1.80 (HANSON, 1956) gemessen werden. Infizierte Hühnerembryonen sterben in kürzerer Zeit ab als bei lentogenen ND-Stämmen. In diese Virulenzgruppe gehören u.a. die Stämme Roakin, Lederle (L), Muktesvar, Komarov, Hertfordshire (H), Beaudette und Haifa (NITZSCHKE und SCHMITTDIEL, 1960; TOTH, 1965). Die mesogenen Stämme führen auch bei ihrer Verwendung als Lebendimpfstoff speziell bei jungen Küken unter 4 Wochen in einem gewissen Prozentsatz zu typischen, vor allem auch zu zentralnervösen Impferkrankungen. Nach intramuskulärer, aber auch nach intraokulärer und intranasaler Impfung sind die Ausfälle sehr hoch (bis zu 16 Prozent). Nach oraler Applikation liegt die Erkrankungsquote niedriger (SPALATIN, 1953; ZUIYDAM, 1953; SCHNEIDER, 1954; van WAVEREN und ZUIYDAM, 1955; FOMINA et al., 1958; PROKOFJENA et al., 1959). Für die Trinkwasservakzination gegen ND sind die mesogenen Stämme daher nur bedingt geeignet, das heißt, sie dürfen nur an Hühner verabreicht werden, die älter als 4 bis 5 Wochen sind. Impferkrankungen können aber auch bei diesen Tieren vorkommen. Der Vorteil der mesogenen Stämme ist jedoch ihr außerordentlich gutes Immunisierungsvermögen, das etwa 100- bis 1.000-mal so stark ist wie bei den Stämmen B1 oder LaSota (TOTH und MARKOVITS, 1964).

Bei den Versuchen, den mesogenen Stamm Komarov im Hinblick auf eine unschädliche Impfung zu attenuieren, erzielten HUYGELEN (1965) bzw. KARZWESKI et al. (1969) eine erhebliche Abschwächung der Neurovirulenz durch Serienpassagen in Kälbernieren-Zellkulturen bzw. im Brutei. Im Verlauf der Attenuierung verlor das Virus seine Affinität zu den respiratorischen Schleimhäuten. Auch zu einer Virusausscheidung kam es nach der Trinkwasserimpfung nicht mehr. Dennoch behielt das attenuierte Komarov-Virus seine Immunogenität und wirkte in ca. 1.000-fach geringerer Dosierung als lentogene Impfstämme. Ähnliche Berichte liegen auch für das Zellkultur-adaptierte mesogene Virus vom Stamm Muktesvar vor (VASIC et al., 1966).

Faßt man das Verhalten der verschiedenen ND-Virusstämmen zusammen, erkennt man sehr deutlich, wie stark die Wirksamkeit einer Lebendvakzine vom Virulenzgrad des eingesetzten Impfstammes abhängt. Schon innerhalb der lentogenen ND-Stämme bestehen Unterschiede im immunisierenden Vermögen. So wird der Stamm LaSota zwar als virulenter angesehen als das B1-Virus und daher meist nur an ältere Küken verabreicht. Dafür muß das B1-Virus etwa in der Praxis 10-fach stärker dosiert oder häufiger angewendet werden (WINTERFIELD et al., 1957d; WYNORADNYK et al., 1962; TOTH und MARKOVITS, 1964; LANDGRAF und VIELITZ, 1970, 1972; MONREAL et al. 1971; 1972; VIELITZ und LANDGRAF, 1971).

Wechselbeziehungen zwischen Virulenz und der immunogenen Wirksamkeit werden aber vor allem beim Vergleich zwischen lentogenen und mesogenen ND-Stämmen deutlich (TOTH und MARKOVITS, 1964; MARKOVITS, 1965; HUYGELEN, 1965). Lentogenes Virus ist bei oraler Applikation absolut unschädlich, muß aber zur Erzielung einer Immunität in 100- bis 1.000-facher Konzentration gegeben werden als mesogenes Virus, das aber durch eine zu hohe Komplikationsrate belastet ist.

Bei der Auswahl von Virusstämmen für eine Impfung gegen die Infektiöse Bronchitis (IB) muß zwischen Virulenzgrad und immunogenen Eigenschaften besonders sorgfältig abgewogen werden, da bisher noch keine avirulenten Stämme zur Verfügung stehen (WOERNLE, 1968). In den ersten Versuchen zur Bekämpfung der Infektiösen Bronchitis

wurde sogar vollvirulentes Virus eingesetzt, um die Tiere künstlich zu durchseuchen. Die "Impfung" erfolgte dabei an 5 Prozent der Hühner durch intratracheale Verabreichung. Die starke Virusausscheidung sorgte für eine Immunisierung des ganzen Bestandes (van ROEKEL et al., 1950).

Erst später ging man dazu über, die Virulenz des IB- Virus-Stammes durch Reihenpassagen im Brutei oder in der Zellkultur abzuschwächen. Mit der Virulenz geht hierbei aber auch das immunisierende Vermögen verloren. Solange es eine Immunogenität behält, löst attenuiertes IB-Virus bei einem Teil der Impflinge regelmäßig respiratorische Erkrankungen aus (RAGGI und BANKOWSKI, 1956; RAGGI und LEE, 1957; HOFSTAD, 1956; HOEKSTRA und RISPENS, 1960a, 1960b; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964a, 1964b; von BOLOW, 1966a, 1966b; BALLA et al., 1967; WOERNLE, 1968). In Bezug auf das Verhältnis von Virulenzgrad und immunogener Wirksamkeit beurteilt HOFSTAD (1956) die 42. Eipassage eines IB-Virusstammes als günstig. Schwächer attenuiertes Virus erweist sich immer noch zu virulent, und bereits nach wenigen weiteren Passagen (53. und 67.) immunisiert das Virus deutlich schlechter. Ganz ähnliche Beziehungen stellten auch BIJLENGA (1960), HOEKSTRA und RISPENS (1960, 1960a, 1960b), LITJENS (1965), BENGELSDORFF (1965), von BOLOW (1966b), BECKER und BENGELSDORFF (1966) und HOEKSTRA (1966) auf.

Alle Impfstoffe aus derartigen, m ä ß i g a t t e n u i e r t e n Erregern führen bei einem Großteil der Impflinge zu ernststen Impferkrankungen, gleichgültig, ob sie intramuskulär, intranasal, intraokulär oder intratracheal verabreicht werden (RAGGI und BANKOWSKI, 1956). Dabei treten je nach Applikationsmodus Unterschiede im Grad der Komplikationen, allerdings auch in der Immunitätsrate auf. Insgesamt gesehen sind die Unterschiede zwischen Impfvirus und Feldstämmen recht gering. Lediglich nach oraler Applikation können Impfschäden, zumindest bei älteren Tieren, auf einem akzeptablen Maß gehalten werden (BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964a).

Um auch junge Küken frühzeitig schützen zu können, muß IB-Virus noch s t ä r k e r a t t e n u i e r t werden. Der Stamm Massachusetts 82828 und der von Natur aus mildere Stamm Connecticut 5968 (JUNGHERR et al., 1956) eignen sich hierfür besonders. Durch

starke Attenuierung des Massachusetts-Stammes z.B. konnte die Erkrankungsrate nach oraler bzw. nasaler Verabreichung von 100 Prozent auf 48 Prozent bzw. 25 Prozent gesenkt werden (von BÖLOW, 1966a). Gleichlautende Ergebnisse erzielten auch HOEKSTRA und RISPENS (1960, 1960a, 1960b) mit einer holländischen Variante des Massachusetts-Virus (BIJLENGA 1956, 1960). Auf dem Niveau der 52. Passage ("H 52-Virus") folgten der Impfung 1- bis 4wöchiger Küken heftige respiratorische und allgemeine Schäden. Erst nach der 120. Passage ("H 120-Virus") konnte dieser Virusstamm auch für die Vakzinierung junger Küken eingesetzt werden. Gegenüber dem virulenteren Virus der 52. Passage war jedoch bei Vakzinen aus H 120-Virus eine 100-fach höhere Dosierung für einen ausreichenden Immunschutz notwendig.

Heute ist es üblich, Küken zunächst mit einem milden Impfvirus zu vakzinieren (BENGELSDORFF, 1965, 1966; BALLA et al., 1967). Dafür stehen derzeit das H 120-Virus und der attenuierte Stamm Connecticut allein oder kombiniert zur Verfügung. Eine belastbare Immunität kann hiermit allerdings nicht bewirkt werden. Dazu bedarf es einer Revakzinierung, für die das H 52-Virus und der attenuierte Stamm Massachusetts verwendet werden. Die letztgenannten Stämme sind wegen ihrer Virulenz für die Erstimpfung empfänglicher Küken ungeeignet (von BÖLOW, 1969).

Bei der Bekämpfung der Aviären Encephalomyelitis (AE) der Küken setzt man enterotrope Stämme ein, die aufgrund ihrer Kontagiosität zu einer guten Bestandsimmunität führen (von BÖLOW, 1964).

Die Virulenz der Impfstämme für Küken scheint stark von der Art der Applikation abzuhängen. Entsprechende Versuche unternahmen CALNEK und JEHNICH (1959b) mit einer Vakzine aus eiadaptiertem AE-Virus. Nach Applikation mittels Spray stellten sich bei 1 Prozent, nach wing web-Inokulation bei 40 Prozent und nach intramuskulärer Impfung bei 14 Prozent der vakzinieren Tiere eine Impferkrankung ein. Nur die orale Verabreichung mittels Pipette erwies sich als unschädlich. Auch in den Versuchen von TAYLOR (1960) traten nach intramuskulärer und Flügelstich-Impfung post-vakzinale Reaktionen auf, nicht aber nach Applikation über das Trinkwasser. Die generell gute Verträglichkeit verschiedener AE-Stämme (C 2652, C 3014 E und H 43) bei enteraler Gabe bestätigen auch Labor- und Feldversuche von

GYLSTORFF und KRAUSS (1964), die das Impfvirus nur einem geringen Teil (1 Prozent) der Impflinge direkt in den Kropf instillierten.

In neueren Versuchen von BENGELSDORFF und BERNHARDT (1972) erwies sich der AE-Stamm Calnek 1143 nach Trinkwasserapplikation selbst bei 5- bis 2.000-facher Oberdosierung als vollkommen unschädlich.

Die AE-Impfstämme können also, nimmt man die orale Verabreichung als Maß, als avirulent bezeichnet werden. Ihre Eignung als Trinkwasser-Impfstoff verdanken sie aber der Tatsache, daß sie sich im Impfling gut vermehren und über ihre intensive Ausscheidung eine Populationsimmunität aufbauen.

Bei der Infektiösen Laryngotracheitis (ILT) des Geflügels kommen mehrere Verlaufsformen vor. Die seltenere ist die epizootische, die zu akuten, schweren Erkrankungen mit hoher Mortalität führt (PULSFORD, 1963). Häufiger sind jedoch die Fälle, in denen schwach virulente Stämme in enzootischer Form zu milden, oft atypischen oder unerkannten Erkrankungen mit geringer Todesrate führen (PULSFORD, 1963; MAYR et al., 1964; COETZEE und ABRAMS, 1965; GRAUS-GRUBER et al., 1967). Die einzelnen Virusstämme verhalten sich zwar serologisch einheitlich, haben aber außer in ihrer Virulenz auch sehr große Unterschiede bezüglich Gewebeaffinität und Immunogenität.

Für die Impfung werden milde Feldstämme ausgewählt, deren Virulenzgrad bei der jeweiligen angewandten Vakzinationsmethode besonders niedrig ist. Neben der Impfung über die Federfollikel hat sich die kloakale Immunisierung als vorteilhaft erwiesen (GRATZL und KÖHLER, 1968). Verschiedene Impfstoffe sind hierfür gut geeignet: Sie sind unschädlich und bewirken eine belastbare Immunität. Verabreicht man derartige Impfstoffe aber mittels Spray oder intranasal, kann es zu beträchtlichen Komplikations- und Todesraten kommen (PULSFORD, 1963).

Die Definition der Virulenz hängt beim ILT-Virus entscheidend davon ab, wie die Virusstämme geprüft werden. Die schwächsten Impfschäden scheinen nach Vakzinierung über das Trinkwasser aufzutreten.

Dabei fehlt auch eine Virusausscheidung, die aber beobachtet wurde, wenn die Hühner das gleiche Virus kloakal, intratracheal, intra-konjunktival oder intranasal erhielten (MARKHAM et al., 1961).

Da die Infektiöse Laryngotracheitis heute nur eine geringe wirtschaftliche Rolle spielt, liegen über Impfungen sehr wenige Berichte vor. Bei den meisten beschriebenen Impfstoffen basiert der Impferfolg jedoch auf einer bestimmten Virulenz des verwendeten Virusstammes.

Für die Schutzimpfung gegen Hühnerpocken stehen Lebendimpfstoffe aus drei unterschiedlichen Virusarten zur Verfügung. Dabei kommen schwachvirulente homologe Virusstämme ("H-Stämme") zum Einsatz, außerdem das heterologe Putenpocken-Virus ("P-Stämme") und das heterologe Taubenpocken-Virus ("T-Stämme"). Bezüglich Sicherheit und Unschädlichkeit sind die H-Stämme problematischer als heterologe Stämme. Wegen ihres besseren und zuverlässigen Immunisierungsvermögens haben Impfstoffe aus H-Stämmen jedoch die größere Bedeutung gewonnen (MAYR, 1959).

Bei der Anwendung von H-Virus muß man zwischen mehr oder weniger schwachvirulentem Naturvirus einerseits und künstlich attenuiertem Virus andererseits unterscheiden. Da Hühnerpockenimpfstoffe bisher stets kutan verabreicht wurden, wird der Virulenzgrad der eingesetzten Virusstämme immer parenteral geprüft. MAYR (1959), HAMANN (1960) und EISSNER (1963) sehen in der intravenösen Testinfektion von Eintagsküken eine sichere Beurteilungsmethode für die Virulenz von Kutanvakzinen aus H-Virusstämmen. Dieser Maßstab scheint BENGELS-DORFF und SCHNEIDER (1962a, 1962b) jedoch zu streng. Nach ihrer Ansicht läßt sich die Schädlichkeit oder Unschädlichkeit von kutan eingesetzten Vakzinen durch intramuskuläre Infektion von Eintagsküken hinreichend erfassen. Auch die unterschiedlichen Hauteffloreszenzen nach kutaner Applikation können Aufschluß über den Virulenzgrad des verwendeten Virus geben (SZAKMARY, 1961).

Bei der bisher üblichen Hühnerpockenimpfung mit der wing web-Methode scheint bei der Verwendung von H-Stämmen ein Impferfolg nicht von einer Restvirulenz des Impfvirus abzuhängen. So vermag das hochattenuierte HP-1-Virus, das nach 350 Zellkulturpassagen seine

Virulenz für Eintagsküken selbst nach intravenöser Verabreichung hoher Dosen verloren hat (MAYR und MALICKI, 1966), Küken nach einer kutanen Impfung sicher gegen eine Testinfektion zu schützen (RATH, 1971; MAYR et al., 1971a), ohne daß es höher dosiert werden mußte.

Daß die generell schwächer virulenten T-Stämme für die Schutzimpfung gegen Hühnerpocken nur bedingt taugen, haben u.a. die Versuche von MENASCE (1968) gezeigt, der Küken sowohl mit T- wie auch H-Virus über das Trinkwasser zu impfen versuchte. Das Taubenpocken-Virus erwies sich hierbei als völlig ungeeignet, während ein H-Stamm mit geringer Restvirulenz die Versuchstiere immerhin in sehr hohen Dosen immunisieren konnte. Die bei diesen Küken auftretenden Impläsionen sprechen gegen die Unschädlichkeit des Verfahrens.

In den Versuchen von MAYR et al., (1971a, 1971b) konnte stets bewiesen werden, daß auch ein absolut avirulentes Impfvirus bei oraler Applikation einen belastbaren Schutz vermitteln kann.

Betrachtet man den Einfluß des Virulenzfaktors auf den Erfolg einer enteralen Immunisierung zusammenfassend, muß man zunächst nach den Kriterien fragen, die für Virulenzbestimmungen dienen. Ein genereller Maßstab hierfür bei den Geflügelviren ist nicht vorhanden. Es hat sich aber gezeigt, daß die Virulenz eines Virus dann am empfindlichsten nachgewiesen werden kann, wenn das geprüfte Virus in direkten Kontakt mit dem System gebracht wird, zu dem es die größte Affinität besitzt. Dieses ist bei Newcastle Disease und Infektiöser Bronchitis der Respirationstrakt. Virulenzbestimmungen auf oralem oder nasalem Wege entsprechen damit auch den Bedingungen bei der enteralen Impfung. Eine Virulenzprüfung des Pockenvirus wird bisher ausschließlich parenteral durchgeführt. Dies entspricht nicht den Verhältnissen bei der oralen Vakzinierung.

Außer bei der Newcastle Disease und bei Pocken ist ein Impferfolg bei den Viruskrankheiten des Geflügels abhängig davon, daß das Impfvirus eine gewisse Restvirulenz besitzt. Man benützt daher milde Feldstämme oder schwach attenuiertes Virus. Jede weitere Erregerabschwächung führt nicht nur zur Abnahme der Virulenz, sondern gleichzeitig auch zu einem Verlust der Immunogenität.

Dieser qualitativen und sehr deutlichen Beziehung stehen bei der Newcastle Disease und bei den Hühnerpocken quantitative Verhältnisse gegenüber. Auch hier wird durch relativ virulentes Impfvirus am sichersten eine Immunität erzeugt. In beiden Fällen existieren aber auch vollkommen avirulente Virusstämme (natürlich oder attenuiert), die zu einer Immunisierung erfolgreich eingesetzt werden können. Allerdings muß hierbei sehr hoch dosiert werden, da sich die Impfstoffe oft wie Vakzinen aus inaktivierten Erregern verhalten.

2.3.3 Impfstoffzusätze

Zur Wirksamkeitssteigerung ist es üblich, Vakzinen verschiedene Substanzen beizumischen, die als Adjuvantien bzw. Adsorbentien bezeichnet werden. Sie haben ihre Bedeutung vornehmlich bei der parenteralen Anwendung von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern.

Auch bei der oralen Immunisierung - vor allem mit Totimpfstoffen - hat man durch derartige Mittel versucht, den Impferfolg zu vergrößern. Unter den eingesetzten Impfstoffzusätzen finden sich Freundsches Adjuvans und Aluminium-Hydroxyd ebenso wie bakterielle Endotoxine oder auch Suspensionsvermittler.

Allen diesen Versuchen war ein Erfolg bisher versagt. Auch eine Applikation von Gallepräparaten oder säureneutralisierenden Verbindungen vor der Impfung, um die Passage des Antigens bzw. Impfvirus durch den Magen und die Resorption im Dünndarm zu fördern, hatten auch die immunogene Wirkung der oral verabreichten Impfstoffe keinen Einfluß; dergleichen der Zusatz von Aristolochiasäure zum Impfstoff, mit der Absicht, die Resorptionsquote zu erhöhen, wie auch die Lösung in Dimethylsulfoxyd (DMSO) zur Steigerung der Gewebedurchlässigkeit (Literatur bei RAETTIG, 1971).

Bessere Immunisierungsergebnisse traten auch nicht ein, wenn Lebendimpfstoffen Stabilisatoren zum Schutz des Impfvirus beigemischt wurden. Zusätze von Trocken- oder Magermilch in unterschiedlichen Konzentrationen hatten weder einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität

des Impfvirus im Trinkwasser noch auf die Ausbildung der Immunität bzw. der spezifische Antikörper (WINTERFIELD und SEADALE, 1957c; WINTERFIELD et al., 1957d; ZUBOCY und AGEeva, 1968; ALLER UND ALLAN, 1970; JASCENKO, 1970). MAREK und RASZEWSKA (1959) konnten sogar einen negativen Effekt durch Zugabe von Milch zur Geflügelpestvakzine feststellen.

2.4 Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg oral eingesetzter Lebendimpfstoffe

Bei jeder Impfung ist in der Regel eine Immunitätsentwicklung nur dann zu erwarten, wenn dem Impfling genügend Antigen zugeführt wird. Sicher trifft dies für Lebendimpfstoffe nicht immer zu. Bei manchen dieser Vakzinen vermehrt sich der Impfkeim im Organismus so stark, daß die Impfdosis minimal sein kann. Derartige Impfstoffe sind bezüglich Unschädlichkeit jedoch mit Vorsicht zu verwenden. Lebendimpfstoffe aus schwach- oder avirulenten Mikroorganismen gleichen in ihrem Verhalten Vakzinen aus inaktivierten Erregern. Bei ihnen wird der quantitative Faktor immer Bedeutung besitzen (DANNER und MAYR, 1972).

Ganz allgemein gelten für Impfstoffe Gesetzmäßigkeiten zwischen einer Minimaldosis, auf die der immunologisch sensibelste Impfling gerade noch anspricht, einer Optimaldosis, die einen ausreichenden Populationsschutz im Sinne einer erfolgreichen Impfung ausbildet und einer Maximaldosis, auf die selbst der immunologisch trägste Impfling reagiert. Die Beziehung zwischen Impfdosis und Immunitätsquote kann in Form einer Gauß'schen Summenkurve dargestellt werden (EISSNER und SIEGERT, 1955; GEHRING und GEISS, 1958). Mit der applizierten Impfstoffmenge wächst in gesetzmäßiger Weise auch die Zahl der immunen Tiere (PRIGGE und SCHAFER, 1939).

Bei der Frage der Impfdosis spielen auch der Vakzinationsmodus und die Virulenz des Impfstammes eine Rolle. Die verschiedenen Impfstoffe

müssen getrennt betrachtet werden, da die immunologische Reaktion der Impflinge bei den einzelnen Impfungen sehr unterschiedlich ist. Schlußfolgerungen werden dadurch kompliziert.

Für die orale Impfung gegen die Newcastle Disease haben verschiedene Untersuchungen die Abhängigkeit des Impfschutzes von der Impfdosis nachgewiesen (WINTERFIELD et al., 1957d; BANKOWSKI, 1958; GRUN und HUDSON, 1964).

Bei der Trinkwasservakzinierung mit dem Stamm B1 sind nach MONREAL et al. (1972) pro Tier $2 \cdot 10^6$ EID₅₀ nötig, um eine Antikörperbildung bei allen Impflingen zu stimulieren. Die Impfdosis 10^6 EID₅₀ und höher für den Impfstamm Hitchner B1 wird von einer Reihe von Untersuchern für eine erfolgreiche Immunisierung als erforderlich erachtet (LUGINBUHL et al., 1955; WINTERFIELD et al., 1957b, 1957c, 1957d; BRAN et al., 1959; HOEKSTRA, 1959; SCHNEIDER, 1960; BOSGRA und ROERINK, 1961; MEYN und PETTE, 1961; GEISSLER und KRÖGER, 1963; SCHNEIDER und BENGELSDORFF, 1963a, 1963b; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1963a, 1963b, 1964b; CAPORALE et al., 1963; HUYGELEN et al., 1964; MONTI 1964; KROSLAK et al., 1964; van der HEIDE et al., 1967; LANDGRAF und VIELITZ, 1970; MONREAL et al., 1972).

Der in den staatlichen Prüfungsvorschriften festgelegte Mindestvirusgehalt für eine Newcastle Disease-Trinkwasservakzine (Stamm Hitchner B1) wird mit einer Dosis von 4×10^9 EID₅₀ pro 1.000 Tiere angegeben. Rechnerisch könnte im Idealfall jedes Tier eine Impfdosis von $10^{6,6}$ EID₅₀ aufnehmen (MONREAL, 1971).

Im Hinblick auf eine erfolgreiche Vakzination von großen Tierbeständen muß der Impfdosis eine noch größere Bedeutung zugemessen werden als bei Laboratoriumsversuchen (MONTI, 1964). Die Trinkwasservakzination besitzt ihren größten Unsicherheitsfaktor in der schlechten Dosierbarkeit des Impfstoffes für jeden einzelnen Impfling. Wiederholt wurde festgestellt, daß bei Massenimpfungen gegen Newcastle Disease ein gewisser Prozentsatz der Impflinge keine Immunität ausbildet (WINTERFIELD und SEADALE, 1957a; WYNOHRADNYK et al., 1962). Für einen sicheren Bestandsschutz erweist sich eine über der Optimaldosis

liegende Impfstoffmenge angemessen.

Für den einzelnen Impfling scheint eine über dem Optimum liegende Impfvirusdosis den Immunisierungserfolg - Höhe der Antikörperbildung und Ergebnis der Testinfektion - nicht zu erhöhen. Eine zu hohe Dosierung kann sich sogar ungünstig auf den Erfolg der Revakzinierungen auswirken. GRUN und HUDSON (1964) und CHERBY (1967) wiesen u.a. nach, daß der optimale Zeitpunkt für eine Revakzinierung von der Dosierung der Erstimpfung abhängig ist.

Bei Kombinationsimpfungen gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bronchitis müssen die einzelnen Impfstoffkomponenten in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander stehen (HANSON et al., 1956; RICHTER, 1958; BRATT und RUBIN, 1967; BENGELSDORFF, 1971). Nach BENGELSDORFF (1971) vermehrt sich das IB-Virus schneller im Organismus. Bei einer zu hohen Dosierung der IB-Komponente wird die ND-Immunität nachteilig beeinflußt.

Bei der oralen Impfung gegen die Infektiöse Bronchitis (IB) konnte HOEKSTRA (1966) eine Abhängigkeit der Immunitätsbildung vom Attenuierungsgrad einerseits und von der Impfstoffdosis andererseits aufzeigen. Bei einer einmaligen Vakzination mit dem noch relativ virulenten H 52-Virus konnte eine Einzeldosis von $10^{3,1}$ EID₅₀ pro Impfling eine 50 %ige Immunität hervorrufen, während diese Schutzrate durch stärker attenuiertes Virus (H 120) erst mit einer 100-fach höheren Impfdosis erzielt werden konnte. H 120-Virus führte 100-fach verdünnt nur noch bei 11 Prozent der Impflinge zu einem belastbaren Schutz.

Aufgrund dieser Versuche scheint die geforderte Virusmenge von 10^4 EID₅₀ pro Impfling (von BOLOW, 1969) als sehr gering; entsprechend werden Dosierungen zwischen 10^5 bis 10^6 EID₅₀ für die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe von der Mehrzahl der Untersucher als immunologisch ausreichend angesehen (HOEKSTRA und RISPENS, 1960a; 1960b, 1966; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964b; BENGELSDORFF, 1965; van der HEIDE et al., 1967; STUMPEL, 1969).

Oral-Vakzinen gegen Aviäre Encephalomyelitis riefen bei Küken hohe, der Impfvirusdosis direkt proportionale Antikörperkonzentrationen hervor. Die Testinfektionsergebnisse waren dagegen von den Impfdosierungen unabhängig. (CALNEK und JEHNICH, 1959b; CALNEK et al., 1961; BENGLSDORFF und BERNHARDT, 1972).

Eine Abhängigkeit des Impferfolges von der Impfdosis ist bei Pocken seit langem bekannt. Die meisten diesbezüglichen Beobachtungen betreffen die kutane bzw. perkutane Impfung. HARTWIGK und KRASSELT (1959) konnten ähnliche Erfahrungen bei den Geflügelpocken machen.

Daß bei der oralen Immunisierung der quantitative Faktor eine entscheidene Rolle spielt, geht aus den Befunden von MENASCE (1968) hervor. Er konnte bei der oralen Impfung von Küken gegen Hühnerpocken nur dann eine nachweisbare Immunität erzielen, wenn so grosse Virusmengen appliziert wurden, daß es besonders bei jungen Impflingen zu postvakzinalen Reaktionen kam.

Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Trinkwasservakzinierung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten Stamm HP-1 konnten DANNER und MAYR (1972) aufstellen. Es zeigte sich deutlich, daß auch bei der Applikation von Lebendimpfstoffen die quantitativen Verhältnisse berücksichtigt werden müssen. Dies gilt besonders für hoch attenuiertes Virus. So war der Impferfolg bei der oralen Impfung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten HP-1-Virus der 400.Zellkulturpassage direkt von der Impfdosis abhängig. Bei zweimaliger Vakzinierung von Küken im Abstand von 3 Wochen bewirkte eine Einzeldosis von 10^8 KID_{50} pro Tier und Impfung eine nahezu 100%ige Immunität. Eine zehnfach geringere Dosis führte nur bei etwa 75 Prozent der Impflinge zu einem belastbaren Schutz. Eine hundertfach kleinere Impfung ließ einen für die Praxis brauchbaren Impfschutz vermissen.

2.5 Beziehungen zwischen Impfvorgang und Impferfolg

Nicht nur Impfling, Impfstoff und Impfdosis beeinflussen den Erfolg

einer Impfung, sondern auch die Impfung selbst, d.h. die Impftechnik und die Art der Applikation.

2.5.1 Einfluß der Impftechnik

Gerade bei der oralen Medikation in Geflügel-Großbetrieben spielt die Applikationstechnik eine nicht zu unterschätzende Rolle (GYLSTORFF, 1966; LODERS, 1969; SIEGMANN und LODERS, 1970). Dies gilt sicher in besonderem Maße für die orale Anwendung von Lebendvakzinen. Eine erfolgreiche Immunisierung verlangt pro Impfling eine bestimmte Mindestimpfdosis. Ob bei der Trinkwasservakzination eine ausreichende Antigenmenge aufgenommen wird, hängt natürlich primär von der Qualität des verwendeten Impfstoffes ab. Wesentlich sind aber auch die Haltbarkeit des Virus im Trinkwasser und damit verbunden die Zeitdauer der Vakzinaufnahme sowie das Aufstellungs- und Tränkesystem.

Die Haltbarkeit des Impfantigens und damit auch der Erfolg der Immunisierung werden u.a. von der Temperatur des Wassers beeinflusst, dem der Impfstoff zugegeben wird. Zwischen 22°C und 27°C soll die Wirksamkeit einer ND-Vakzine nach FOMINA et al. (1958) und ALLER und ALLAN (1970) vier Stunden, nach BINAGHI et al. (1955) sowie WINTERFIELD u. SEADALE (1956) sogar 24 bis 36 Stunden erhalten bleiben. Ein ca. 400-facher Titerverlust tritt gemäß ALLER u. ALLAN (1970) erst nach 72 Stunden, nach den Beobachtungen von LUGINBUHL et al. (1955) allerdings schon innerhalb von 28 Stunden ein.

Nach RAGGI (1958) soll eine IB-Trinkwasser-Vakzine ihren Virustiter bei 25°C Wassertemperatur 24 Stunden lang konstant behalten. LUGINBUHL et al. (1955) konnten dagegen auch bei 25°C schon nach 11 Stunden einen Abfall des Virusgehaltes um den Faktor $10^{2,6}$ nachweisen.

Bei der Impfung gegen Hühnerpocken konnte RATH (1971) nachweisen, daß sich das Impfvirus 6 Stunden ohne Titerverlust im Trinkwasser hält.

Auch die Beschaffenheit des Wassers kann sich auf die Haltbarkeit des Impfantigens auswirken. In Versuchen mit einer ND-Vakzine aus BI-Virus schienen jedoch die Härte des Wassers, sein Salz-, Rost- und Eisengehalt, sowie pH-Schwankungen im Bereich von 4,4, bis 9,2 ohne Einfluß zu bleiben (WINTERFIELD et SEADALE, 1956). Schädigend wirkt auf ND- bzw. IB-Vakzinen nach WINTERFIELD et SEADALE (1956) bzw. WOERNLE (1968) chlorhaltiges Wasser. Daneben wird das Impfvirus durch Fluor-gehalt, Streu, Futter, fäkale Verunreinigungen und einige nicht näher zu determinierende Faktoren in bestimmten Wasserproben angegriffen (WINTERFIELD et SEADALE, 1956), ebenso durch Rückstände von Arznei- und Desinfektionsmitteln (SCHNEIDER, 1960).

Auch das Material der Tränken kann an das Trinkwasser Substanzen abgeben, die ihrerseits das Impfvirus schädigen. GRAMENZI (1964) hat hierzu Untersuchungen angestellt. Wurde Tieren eine ND-Vakzine in Glas-, Plastik- bzw. Aluminiumbehältern angeboten, resultierten sehr gute Schutzquoten (95%, 90,4% bzw. 88,5%). Nach Aufnahme der Vakzine aus Zinktränken entwickelten dagegen nur 10 Prozent der Tiere eine belastbare Immunität. Als vollkommen ungeeignet erwiesen sich Eisenbehälter.

Ob sich bei der Trinkwasservakzinierung verschieden lange Aufnahmezeiten auf die Immunitätsentwicklung auswirken, prüften WINTERFIELD u. SEADALE (1957b). Sie verabreichten Hühnern eine ND-Vakzine in gleicher Einzeldosis über unterschiedlich lange Zeiträume. Die einzelnen Tiergruppen hatten 2, 8 oder 24 Stunden lang Kontakt mit dem Impfvirus. Alle Gruppen reagierten aber in der Antikörperbildung gleich, so daß der Zeitfaktor offensichtlich keine Rolle spielt.

Untersuchungen mit verschiedenen Aufstellungs- und Tränkesystemen zeigten bei einer ND-Impfung die Vorteile von Bodenhaltung und

R i n n e n t r ä n k e n gegenüber Käfighaltung mit N i p p e l - t r ä n k e n (KENTRUP, 1972; MONREAL et al., 1972). Die Autoren erklären dies damit, daß der Impfstoff über die Nippeltränken wie bei einer artifiziellen oesophagalen Applikation aufgenommen wird und dabei nur in ungenügenden Kontakt mit der Resorptionsfläche des Nasen-Rachenraums und der Schnabelhöhle kommt.

Auf die Schwierigkeit, Medikamente in weit angelegten Tränkesystemen gleichmäßig zur Verteilung zu bringen, ist öfters hingewiesen worden (SIEGMANN und LODERS, 1970; DORN, 1971). Dasselbe gilt auch für Impfstoffe. Technische Sorgfalt ist hier eine wichtige Voraussetzung und führt zu guten Resultaten (LÖTHGEN, 1971).

2.5.2 Applikationsmodus und Impferfolg

Der Ort des natürlichen oder künstlichen Erregereintritts kann für die Pathogenese von Infektionskrankheiten bedeutende Konsequenzen haben. Entsprechend hängt bei der aktiven Schutzimpfung der Verlauf der Immunogenese davon ab, an welcher Stelle des Organismus der Impfstoff appliziert wird.

Bei der parenteralen Verabreichung von Vakzinen aus inaktivierten Erregern wird eine bestimmte, unveränderliche Antigenmenge in lokalen Kontakt mit zirkulierenden Anteilen des Immunsystems gebracht (Makrophagen). Bei Lebendvakzinen tritt hierzu meist noch ein weiterer Effekt: die parenteral eingebrachten Impfstoffe vermehren sich am Injektionsort - entsprechend der Eintrittspforte bei natürlicher Infizierung - und gelangen von dort aus über das Blut an die primär affinen Organe und deren Lymphzentren.

Ähnliche Vorgänge machte man früher auch für die Wirkung enteral applizierter Impfstoffe verantwortlich. In einigen Fällen, wie bei der Schluckimpfung gegen die Poliomyelitis des Menschen, ist die lokale Erregervermehrung im Digestionstrakt tatsächlich der erste Schritt der Immunitätsentwicklung. Heute weiß man jedoch, daß Makromoleküle wie

z.B. Infektionserreger ohne weiteres direkt durch die Schleimhäute persorbiert werden können (HILDEBRAND und WOLCHOW 1962; RAETTIG, 1963; 1964; HOFFMANN 1965; HOCHSTEIN-MINTZEL et al., 1972). Damit gelangen sie rasch zu den lokalen Lymphzentren (Rachenring, Peyersche Platten usw.), aber auch ins strömende Blut.

Bei einer enteralen Impfung kommt es also zum Zusammenwirken mehrerer immunologischer Vorgänge. Die Qualität der resultierenden Immunität wird u.a. davon abhängen, wieviel Antigen direkt in den Blutstrom gelangt ist, wieviel Antigen von den lokalen Lymphzentren aufgefangen wurde, oder ob eine Erregervermehrung in der Schleimhaut stattgefunden hat.

Ebenso wie man zwischen parenteraler und enteraler Impfung unterscheiden muß, kann man innerhalb der enteralen Impfung nicht eine Applikationsform mit der anderen gleichsetzen. Aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit finden Mikroorganismen in den verschiedenen Abschnitten des Respirations- und Disgestionstraktes ein unterschiedliches Milieu. Außerdem scheinen einige dieser Organabschnitte besonders geeignet für eine Persorption zu sein.

Hierzu hat HOFFMANN (1965) eindeutige Modellversuche mit Phagen durchgeführt. Gemessen an der nach lokaler Applikation auftretenden Phagenkonzentration im Blut der Versuchstiere wurde die höchste Persorptionsrate bei Instillation in die Nasenhöhle und ebenso bei intratrachealer Gabe erreicht. Weniger günstig erwies sich eine Applikation auf die Schleimhäute der Mundhöhle, während die Verabreichung direkt in den Oesophagus nur zu einer geringen Persorption führte.

Die Entscheidung, ob parenteral oder enteral geimpft und welche enterale Applikationsform angewendet werden soll, hängt von folgenden Faktoren ab: - Lebendimpfstoffe oder Vakzine aus inaktivierten Erregern,

- chemisch physikalische Beschaffenheit des Impfvirus,
- pathogenetische Verhältnisse der betreffenden Infektionskrankheit,
- Virulenz des eingesetzten Impfstammes,
- Ausscheidungs- und Streuungsverhältnisse,
- praktikable Dosiermöglichkeit,

- ökonomische (bzw. in der Humanmedizin psychologische)
Faktoren.

Bei der Newcastle-Erkrankung wird das Virus hauptsächlich über die Schleimhäute des Respirations- bzw. des oberen Disgestionstraktes (Schnabelhöhle) resorbiert (SPALATIN, 1953; LUGINBUHL et al., 1955; KOHN, 1955; WINTERFIELD und SEADALE, 1957a, 1957d; BOJADZIEV et al., 1968). BOJADZIEV et al. (1968) wiesen nach, daß auch bei der Schutzimpfung die beständigste Immunität nach der Aufnahme des Impferregers über die Atemwege eintritt. Nach DARDIRI et al. (1957), BRAN et al. (1958), KURUDIMOV et al. (1965), BEARD u. EASTERDAY (1967a), SUGIMURA et al. (1971) und MONREAL et al. (1972) ist die tracheale Verabreichung des Impfvirus durch Flüssig-aerosol bzw. Staub die wirksamste Vakzinierungsmethode gegen Newcastle Disease. ANDRE (1966) bezeichnet die Spray-Vakzinierung als die erfolgversprechendste Impfmethode. Mit der Affinität des ND-Virus zum Respirationstrakt erklärt BALDELLI (1956), warum jüngere Tiere (Alter 10 Tage) über das Trinkwasser besser immunisierbar sind als ältere. Durch die Unfähigkeit junger Küken, richtig zu schlucken, gelangt nämlich ein Teil der impfvirushaltigen Flüssigkeit an die Schleimhäute des Respirationsapparates und kann somit an den Prädisloktionsstellen haften. Die maßgebliche Rolle bei der Immunisierung über das Trinkwasser spielt also der obere Abschnitt des Disgestions- und besonders des Respirationstrakts.

In neueren Untersuchungen haben MONREAL et al. (1971, 1972) ferner nachgewiesen, daß bei verschiedenen Vakzinationsmethoden auch unterschiedliche Minimaldosen nötig sind, um eine spezifische Antikörperbildung zu induzieren. Bei trachealer Applikation führten relativ geringe Virusdosen (10^2EID_{50}) einer Hitchner-B1-Vakzine bei allen Tieren zu einer Immunantwort, die sich durch hohe HAH-Antikörpertiter auszeichnete. Bei der Instillation direkt in den Kropf, die einem unmittelbaren Abschlucken des Impfvirus ohne Haftung im Nasen-Rachenraum und in der Schnabelhöhle entspricht, ließ sich selbst bei hohen Impfdosen (bis 10^6EID_{50}) nur in Ausnahmefälle eine geringe humorale Immunreaktion feststellen. Nach der oralnasalen Verabreichung einer Dosis von $2 \times 10^4 \text{EID}_{50}$ und bei rein oraler Instillation mit etwa $2 \times 10^5 \text{EID}_{50}$ traten bei allen geimpften Tieren humorale Antikörper auf. Andere Untersucher fanden dagegen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich

Minimaldosis und Impferfolg zwischen intranasaler und Trinkwasservakzinierung (RUSSEFF und MITEFF, 1957; WINTERFIELD und SEADALE, 1957b; SCHMIDT, 1959; PROKOFJENA et al., 1959; SCHNEIDER, 1960; PAPARELLA, 1962; NISHIMURA et al., 1965; SOKKAR, 1966b; ZUBOCY und AGEEVA, 1968).

Die Ergebnisse parenteraler Impfungen gegen Newcastle Disease mit Lebendvakzinen (intramuskulär, subkutan, wing-web-Methode) waren sehr unterschiedlich. In vielen Fällen verliefen sie erfolgreicher als die auf oralem Wege (GAGLIARDI, 1953; DARDIRI et al., 1957; BANKOWSKI et al., 1958; SCHMIDT, 1959; TOTH und MARKOVITS, 1964; BOJADZIEV und STOILOVA, 1966). Bei Küken mit maternalem Schutz ist jedoch eine intramuskuläre ND-Impfung wenig erfolgversprechend (BORNSTEIN et al., 1952b). Sie wird auch zur Revakzinierung mit Tieren mit unbekanntem Immunstatus als unzuverlässig und nicht geeignet angesehen (MARKHAM 1954). Intramuskulär vakzinierter Tiere hielt eine aerogene Belastungsinfektion nicht stand (BEARD und EASTERDAY, 1967a). Humorale Antikörper entstehen nach parenteraler Vakzination zwar in ausreichender Menge, gewähren aber keinen sicheren Schutz gegen Infektionen über den Respirations- und Verdauungstrakt (SUGIMURA et al., 1970). Dagegen entwickelte sich nach Spray-Impfung eine stabile Immunität sowohl gegenüber der intramuskulären wie auch der aerogenen Testinfektion (BEARD und EASTERDAY, 1967a).

Die Resorption des Infektiösen Bronchitis - Virus ist sowohl über die Schleimhäute des Respirations- wie auch des Digestionstraktes möglich. LUGINBUHL et al. (1955) gelang eine orale Immunisierung mit IB-Virus, das in Gelatine kapseln eingeschlossen war und erst in den Schleimhäuten des unteren Verdauungskanales resorbiert werden konnte. Die Autoren verwendeten allerdings einen virulenten Stamm. HOFSTAD und YODER (1966) untersuchten die Ausbreitung mehrerer IB-Virustypen im Organismus nach verschiedenen Inokulationsverfahren. Ein IB - Feldstamm vermehrte sich, als Aerosol verabreicht, wesentlich stärker in den Geweben als nach direkter nasaler Instillation oder Trinkwasserapplikation. Der Trachea als Ort der Virusvermehrung scheint hierbei eine besondere Rolle zuzukommen.

Auch bei I m p f v e r s u c h e n erzielten HOEKSTRA und RISPENS (1960) durch die intratracheale Virusapplikation die höchsten Antikörperwerte. Sie revakzinieren 5 Monate alte Junghennen, die 16 Wochen zuvor mit einem Trinkwasser-Lebendimpfstoff vakzinieren worden waren. Nur nach intratrachealer Verabreichung des Impfvirus wurde ein starker Anstieg der SN-Antikörperwerte beobachtet. Der Neutralisationsindex (NI) stieg von 2,6 auf 6,0. Nach intramuskulärer und nach oraler Revakzination wurde kein signifikanter Anstieg festgestellt. Ähnlich verliefen Versuche von HOFSTAD (1956). Eine Aerosolvakzinierung mit attenuierten IB-Virus immunisierte Hühner, intranasal verabreicht war das gleiche Material jedoch unwirksam. Bei einer Lebendimpfung mit IB-Virus ist folglich über eine Aerosol- oder tracheale Impfung eine bessere Immunität zu erwarten als nach Trinkwasservakzination (HOFSTAD, 1967). Hingegen sind BENGELSDORFF und SCHNEIDER (1964a) der Ansicht, daß die Immunitätsquote nach Lebendimpfungen nicht vom Applikationsmodus abhängig ist. Intranasal bzw. oral im Alter von 3 bzw. 4 Tagen mit IB-Virus vakzinieren Tiere waren gegenüber einer gleichartigen Testinfektion gleich gut geschützt. Eine aerogene Applikation wurde in diesen Versuchen nicht durchgeführt.

Vergleiche lassen sich insofern schlecht ziehen, als die unterschiedliche Schutzwirkung von IB-Impfstoffen wesentlich mehr vom Stamm und seiner Restvirulenz abzuhängen scheint als vom jeweiligen Applikationsmodus.

Die Immunisierung gegen Aviäre Encephalomyelitis entspricht einer künstlichen Durchseuchung einer Herde mit ausgewählten, virulenten und kontagiösen Virusstämmen (GYLSTORFF et KRAUSS, 1964). Das Impfvirus wird mit den Exkrementen ausgeschieden. Die Stallgenossen immunisieren sich durch Kontakt. Der Applikationsmodus hat hier weniger wegen der Wirksamkeit des Impfstoffes Bedeutung, sondern vor allem hinsichtlich der Unschädlichkeit. Es stellte sich heraus, daß die orale Vakzinierung dem Wunsch nach einer natürlichen, aber klinisch inapparent verlaufenden Infektion zu einem gezielten Zeitpunkt am weitesten gerecht wurde (CALNEK et al., 1960).

Oberwiegend wird das AE-Impfvirus über das Trinkwasser oder durch direkte Instillation in den Kropf (mit Sonden oder Pipetten)

verabreicht (SCHAAF, 1958; CALNEK und JEHNICH, 1959b; TAYLOR, 1960; CALNEK et al., 1961, 1961a; GENTRY, 1962; GYLSTORFF und KRAUSS, 1964; von BOLOW, 1964, 1965; BURTSCHER et al., 1967; SCHNEIDER, 1967; BENGLSDORFF und BERNHARDT, 1972). Bei oralen Einzelimpfungen genügte es, nur einen gewissen Prozentsatz der Tiere einer Herde zu vakzinieren. Über die Impfung von 5 Prozent (HOEKSTRA, 1964; BURTSCHER et al., 1967) bzw. 2 Prozent der Tiere oder weniger (CALNEK et al., 1961; GENTRY, 1962; GYLSTORFF und KRAUSS, 1964; KRAUSS 1965a) wurde ein ausreichender Populationsschutz erzielt. Nach SCHNEIDER (1964, 1967) sowie DORN und KRONTHALER (1964) ist der Vakzinierung über das Trinkwasser der Vorzug zu geben, da durch diese Methode eine schnellere und gleichmäßigere Ausbildung der Immunität zu erzielen ist.

Bessere Schutzquoten werden durch intramuskuläre oder wing-web Vakzinierung bewirkt. Diese Impfmethode verursachten aber die höchsten Verluste. Nach der oralen Vakzinierung konnten dagegen weder Verluste noch Erkrankungen beobachtet werden (SCHAAF, 1958; CALNEK und JEHNICH, 1959b). CALNEK und JEHNICH (1959b) empfehlen, den nicht ganz befriedigenden Populationsschutz nach oraler Vakzination durch eine höhere Dosierung des Impfvirus zu verbessern und so den Impferfolg demjenigen anderer Impfmethode anzugleichen.

Ohne Unterschiede im Erfolg konnten MARKHAM et al. (1961) und MICHAEL (1970) Küken gegen Infektiöse Laryngotracheitis intrakonjunktival, intranasal und oral über das Trinkwasser immunisieren. Auch die intratracheale oder kloakale Impfung scheint gleich gut zu wirken (MARKHAM et al., 1961).

Bei der oralen Impfung gegen Hühnerpocken mit einem attenuierten H-Stamm ist die Vakzinierung über das Trinkwasser der individuellen Impfstoffapplikation mittels Pipette deutlich überlegen. So erkrankten nach intravenöser Testinfektion mit virulenten HP-1-Virus von den mit der Pipette geimpften Küken 33 Prozent, von den über das Trinkwasser vakzinierten Tieren aber nur 14 Prozent an einer generalisierenden Pockenerkrankung. Ähnlich lagen die Verhältnisse bezüglich Hautimmunität nach kutaner Testinfektion (RATH, 1971; MAYR et al., 1971a). Obwohl bei der Pipettenmethode die Einzeldosis etwas niedriger lag als

bei der Trinkwasservakzination, glauben die Autoren, daß die schlechtere Immunitätsbildung nach Verabreichung des Impfvirus mit der Pipette nicht auf quantitative Unterschiede zurückzuführen ist. Sie weisen darauf hin, daß nur beim natürlichen Trinkvorgang eine Persorption des Impfvirus im Rachenraum erfolgen kann. Für eine ausreichende Immunitätsbildung scheint gerade diese Region verantwortlich zu sein.

Die Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken mit einem über 400 Kulturpassagen stark attenuierten Impfvirus ist der kutanen im Erfolg annähernd adäquat. Per os müssen aber wesentlich höhere Virusdosen (ca. 100 - 1.000 fach) appliziert werden als kutan (RATH, 1971; MAYR et al., 1971a).

Faßt man die genannten Versuchsergebnisse zusammen, erkennt man die prinzipielle Eignung einer Reihe von Geflügelviren für die enterale Impfung. Je nach Virusart hängt der Impferfolg aber davon ab, ob das Impfvirus über die respiratorische oder die digestorische Schleimhaut wirksam wird. Bei der praktischen Durchführung der Impfungen muß hierauf geachtet werden. Im Vergleich zur parenteralen Wirksamkeit muß aber bei enteraler Impfung generell höher dosiert werden.

2.6 Der Einfluß der Testmethode auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung bei enteralen Impfungen gegen Viruserkrankheiten des Geflügels

Eine Impfung erfüllt dann ihren Zweck, wenn sie den Impfling oder eine vakzinierte Population gegen die betreffende Infektion zu schützen vermag. Ein solcher praktischer "Impferfolg" läßt sich nur durch die epidemiographische Beobachtung messen. Zur Prüfung des individuellen Impferfolgs ist dieses "natürliche" Bewertungsverfahren nicht geeignet. Hier muß im Impfling selbst experimentell getestet werden, ob die Vakzinierung erfolgreich war oder nicht. Das gleiche gilt für die Erprobung neuer Vakzinen, bevor sie routinemäßig eingesetzt werden. Hierbei ist es in manchen Fällen möglich, Wertbestimmungen nicht im natürlichen Wirt, sondern in kleinen Versuchstieren vorzunehmen. Prinzipiell

bestehen dabei dann keine Unterschiede in den angewandten Prüfmethoden. Diese können in drei Gruppen gesehen werden:

1. Kontrolle der Impfläsion ("take") durch Nachschau (Pocken),
2. Nachweis von humoralen und zellulären Immunitätsmechanismen,
 - a) humorale Antikörper (z.B. neutralisierende, präzipitierende usw.). Da Antikörper geimpfter Mütter auf die Nachkommen übergehen können, ist auch deren Serum ein Indikator für den Impferfolg (beim Geflügel: auch Eidotter),
 - b) sekretorische Antikörper,
 - c) allergische Prozesse und
 - d) immunkompetente Zellen.
3. Belastungsinfektion (Challenge) des Impflings oder, bei Übertragung mütterlicher Antikörper, der Nachkommen.

Alle diese Verfahren müssen als mehr oder weniger künstlich angesehen werden. Ihr Wert für die Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen wird davon abhängen, wieweit sie mit den natürlichen Gegebenheiten kongruieren. Ungeeignete Methoden können den Wert eines Impfstoffes verfälscht wiedergeben (siehe HERBERT, 1970).

Bei enteralen Impfungen gegen Viruskrankheiten des Geflügels werden Wirksamkeitsprüfungen im wesentlichen durch die quantitative Bestimmung von Serumantikörpern im Impfling durchgeführt. Der Nachweis von sekretorischen Antikörpern des IgA-Typs, wie sie von immunkompetenten Zellen (Lymphoidzellen, Histiozyten) des Verdauungs- und Respirationstraktes gebildet werden (BEARD und EASTERDAY, 1967c; KONO et al., 1970; HEUSCHELE und EASTERDAY, 1970), spielt in der Praxis keine Rolle. Serumantikörper finden sich auch in den Nachkommen geimpfter Mütter und werden dort leicht im Serum oder Eidotter nachgewiesen (DORN et al., 1973; SIEGMANN et al., 1974). Darüberhinaus wird beim Geflügel auch die Impfnachschau (Pocken) angewendet, zur Impfstoffprüfung auch die Belastungsinfektion (EISSNER, 1965).

Da die immunologische Reaktion der Impflinge bei den einzelnen Impfungen sehr unterschiedlich ist, müssen die verschiedenen Impfstoffe getrennt betrachtet werden.

Nach der Trinkwasservakzination gegen Newcastle Disease wird der Immunstatus einzelner Tiere oder der Bestände durch Nachweis h a e m a g - g l u t i n a t i o n s h e m m e n d e r S e r u m a n t i k ö r - p e r festgestellt. Dieser Test hat sich in einer Vielzahl von Untersuchungen bewährt und wird von der Mehrzahl der Autoren als eindeutig in der Aussage angesehen (MARKHAM, 1954; WADSWORTH und YOUNG, 1955; BANKOWSKI et al., 1957; DARDIRI et al., 1957; SCHNEIDER, 1960; BENGELSDORFF und JAEGER, 1965; CREANGA et al., 1966; BEARD und EASTERDAY, 1967a; KALETA und SIEGMANN, 1971; LOTHGEN, 1971; MONREAL et al., 1971; VIELITZ und LANDGRAF, 1971).

Die Höhe der Antikörpertiter variiert je nach verwendetem Impfvirus. Bei Vakzination mit dem Hitchner B1 -Virusstamm werden HAH-Werte von 1:20 im allgemeinen als ausreichend betrachtet. Höhere Ergebnisse erzielt man zum Teil mit dem Impfstamm LaSota (WINTERFIELD und SEADALE, 1957a; WINTERFIELD et al., 1957d; GRUN' und HUDSON, 1964; LANDGRAF und VIELITZ, 1970, 1972). JANSEN und LODERS (1971) konnten dieses nicht bestätigen. Der Stamm F (Äsplin) unterscheidet sich nicht vom B1-Virus (WINTERFIELD et al., 1957d; KROSLAK et al., 1964).

Da Obereinstimmung zwischen der Höhe der HAH-Antikörper im Serum einer Henne und im Dotter bzw. Serum ihrer Küken besteht, ist es möglich, wechselseitige Schlüsse über die augenblickliche Immunitätslage vom Elterntier zum Küken und umgekehrt zu ziehen (REUSS und HILBRICH, 1960; DORN et al., 1973; SIEGMANN et al., 1974).

Verschiedene Autoren sind der Meinung, daß sich der HAH-Test nur bedingt für die Prüfung des Immunstatus bei der Newcastle Disease eignet (GEHRING, 1958; MEYN und PETTE, 1961; BOJADZIEV und STOILOVA, 1966).

P r ä z i p i t i e r e n d e A n t i k ö r p e r werden nur durch velogene ND-Virusstämme gebildet (BENGELSDORFF und JAEGER, 1965). Ihrem Nachweis kommt daher bei der Prüfung des Impferfolgs keine Bedeutung zu, da nur mit lentogenen Stämmen vakziniert wird.

Dagegen bestehen enge Beziehungen zwischen HAH-Antikörpern und n e u t r a l i s i e r e n d e n A n t i k ö r p e r n (BEARD und

EASTERDAY, 1967a; KALETA und SIEGMANN, 1971). Beide Antikörpertypen entwickeln sich in den ersten Wochen nach der Impfung parallel. LUGINBUHL et al. (1955) stellten noch 8 bis 9 Wochen p. vacc. eine signifikante Erhöhung neutralisierender Antikörper im Serum fest. Dennoch scheint es, daß der HAH-Test eine größere Aussagekraft besitzt und sich für die Immunitätskontrolle besser eignet (KALETA und SIEGMANN, 1971). Vor allem gilt dies bei jungen Tieren (CREANGA et al., 1966).

Eine vorrangige Rolle bei der immunologischen Abwehr von ND-Infektionen spielen sicherlich lokale Abwehrmechanismen. Sie werden besonders nach enteraler Impfung im Respirationstrakt (BEARD und EASTERDAY, 1967c; HEUSCHELE und EASTERDAY, 1970; YOSHIDA et al., 1971) bzw. im Verdauungskanal (KONO et al., 1970) stimuliert. Der direkte Nachweis immunkompetenter Zellen oder sezernierter Antikörper hat für die Wirksamkeitsprüfung von ND-Vakzinierungen noch keine Bedeutung erlangt.

Das Vorhandensein lokaler Abwehrmechanismen wird jedoch - zusammen mit der zentralen Immunität - durch eine enterale Belastungsinfektion nachgewiesen. Dem natürlichen Ansteckungsmodus bei der Newcastle Disease (über Tröpfcheninfektion) wird dabei in den meisten Untersuchungen entsprochen. Demgemäß läßt sich eine ganze Liste möglicher Challengemodi aufführen: intranasal, Spray, Aerosol, intratracheal, okulonasal, konjunktival und oral (WHITE et al., 1953; ZUIJDAM, 1953; MARKHAM, 1954; LUGINBUHL et al., 1955; RUSSEFF und MITEFF, 1956, 1957; WINTERFIELD und SEADALE, 1957b; WINTERFIELD et al., 1957d; BANKOWSKI et al., 1957, 1958; PETTE, 1961; STUMPEL, 1962; HILBRICH und REUSS, 1963; GRUN und HUDSON, 1964; MONTI, 1964; RICHEY und SCHMITTLE, 1964; GALE et al., 1965; BEARD und EASTERDAY, 1967a, 1967b; LANDGRAF und VIELITZ, 1970, 1972). Hierbei tritt eine interessante Tatsache zutage: Auch Tiere, die keine HAH-Antikörper aufweisen, zeigten sich zum Teil einer Belastungsinfektion gegenüber geschützt. Das gilt vor allem für Jungtiere, die nur in geringem Umfange HAH-Antikörper bilden (MARKHAM et al., 1951; WHITE et al., 1953; SCHMIDT, 1959). In Untersuchungen von SCHMIDT (1959) hielten 72,5 bis 91,7 Prozent der HAH-negativen Jungtiere einer nasalen Belastungsinfektion

stand. Allerdings muß bei diesem Challenge eine gewisse Mindest-Virusdosis angewendet werden, um tatsächlich alle nicht immunen Tiere zu erfassen (GEHRING und GEISS, 1958). Während nach diesen Autoren der zur Testinfektion verwendete Virusstamm keinen großen Einfluß auf das Ergebnis des Challenge ausübt, muß die Mindestdosis bei einem hoch virulenten ND-Stamm 10^3 Infektiöse Einheiten betragen. Um die Wirksamkeitsprüfung noch sicherer zu gestalten, wird eine 1.000-fach stärkere Testdosis vorgeschlagen.

Ebenso, wie Tiere ohne meßbaren Antikörpertiter einen effektiven Impfschutz aufweisen können, gibt es Impflinge, die zwar Serumantikörper haben und auch gegen eine intramuskuläre Testinfektion geschützt sind, einer aerogenen oder intratracheal durchgeführten Testinfektion aber nicht standhalten (BEARD und EASTERDAY, 1967a, 1967b; RICHEY und SCHMITTLE, 1964). Nach diesen Ergebnissen gibt der intramuskuläre Challenge ebensowenig Auskunft über den wahren Immunstatus des Impflings wie der Antikörpernachweis. Eine den natürlichen Gegebenheiten entsprechende Testinfektion (aerogen, intranasal usw.) scheint bei der Newcastle Disease die sicherste Methode zum Wirksamkeitsnachweis einer Impfung zu sein (BANKOWSKI und KINJO, 1965). Dennoch hat sich der Nachweis von haemagglutinationshemmenden Antikörpern generell durchgesetzt und ist im hohem Maße geeignet, den Immunitätsstatus eines geimpften Bestandes festzustellen.

Auch bei Impfungen gegen die Infektiöse Bronchitis (IB) wird der Immunstatus von Beständen routinemäßig über den Nachweis von Serumantikörpern geprüft. Hier sind es die neutralisierenden Antikörper, die einen guten Überblick über einen Herdenschutz vermitteln (BIJLENGA, 1956, 1960; RAGGI und LEE, 1957, 1958, 1965b; HOEKSTRA und RISPENS, 1960, 1960b; BOSGRA und ROERINK, 1961; LITJENS, 1965; von BOLOW, 1967; STUMPEL, 1969). Neutralisierende Antikörper werden über den Eidotter auch auf die Küken übertragen und geben durch ihren Nachweis ebenfalls Auskunft über den mütterlichen Impfschutz. Nach oraler Impfung mit Massachusetts-Virus können neutralisierende Antikörper erstmals nach zwei Wochen erfaßt werden. Ihre Menge steigt bis zur 6. Woche p. vacc. an, um dann allmählich wieder abzusinken (PAGE und CUNNINGHAM, 1962). RAGGI und LEE (1957) geben in einem Neutralisationsindex von 4 (Virusverdünnungsmethode, Serum 1:10 verdünnt)

denjenigen Wert, der eine 100%ige Immunität ausdrückt. Die Höhe der gebildeten neutralisierenden Antikörper hängt auch vom Modus der Schutzimpfung ab. Die intratracheale Virusapplikation wirkt hierbei als stärkeres Stimulans als die orale oder intranasale Impfung (HOEKSTRA und RISPENS, 1960). Auch eine Vakzination mittels Aerosol bewirkte in Untersuchungen von HOFSTAD (1967) nur eine geringe Antikörperbildung. Gegenüber einer Belastungsinfektion waren die Tiere aber voll geschützt.

So gibt auch bei der Infektiösen Bronchitis der C h a l l e n g e - v e r s u c h den Impfschutz am korrektesten an, besonders wenn er intranasal oder intratracheal durchgeführt wird (RAGGI und LEE, 1958; HOEKSTRA und RISPENS, 1960b; BOSGRA und ROERINK, 1961; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964b, 1965; BENGELSDORFF, 1965, 1971; BECKER und BENGELSDORFF, 1966; von BÖLOW, 1966b, 1969). Da die Versuchsbedingungen bei den einzelnen Autoren sehr unterschiedlich waren, kann kaum eine einheitliche Wertung vorgenommen werden. Es wird aber klar, daß der zum Challenge benützte Virusstamm nicht ausschlaggebend für das Prüfungsergebnis ist, da verschiedene IB-Stämme auch gegen heterologes Virus schützen (von BÖLOW, 1966b; 1969). Vielmehr müssen bei der Belastungsinfektion die Virulenz des Challengevirus, die Anzahl der durchgeführten Impfungen und das Alter der Impflinge berücksichtigt werden (BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964b).

Eine wesentliche Rolle kommt der Testinfektion zu, wenn der Impferfolg bei Jungtieren festgestellt werden soll. Beim Vorliegen eines maternalen Schutzes besteht eine Diskrepanz zwischen den gebildeten Serumantikörpern und dem durch Challenge gemessenen, realen Impfschutz (RAGGI und LEE, 1957, 1958, 1965b). Erst im Alter von über 6 Wochen kommt es in solchen Fällen wieder zur Kongruenz zwischen beiden Parametern (RAGGI und LEE, 1965b).

Bei der Erfolgsprüfung von Trinkwasservakzination gegen die Aviäre Encephalomyelitis (AE) kann als sehr rigorose Maßnahme eine intracerebrale B e l a s t u n g s i n f e k t i o n durchgeführt werden (CALNEK und JEHNICH, 1959b; von BÖLOW, 1964, 1965). Für Routine-

untersuchungen hat sich der Nachweis neutralisieren -
der Serumantikörper bewährt, der etwa ab dem 8. Tag
p. vacc. Auskunft über den Immunitätsstatus des Impflings bzw. Be-
standes gibt. Ihr Maximum erreichen die neutralisierenden Antikörper
ca. 4 Wochen p. vacc. und sind noch weitere 4 bis 5 Wochen erfaßbar
(CALNEK und JEHNICH, 1959a). Die Antikörpertiter liegen zwischen 1:11
und 1:20. Dieser humoral funktionierende Immunschutz wird vorteil-
hafterweise über die von Impflingen gelegten Eier getestet. Der von
SUMNER et al. (1957) und TAYLOR und SCHELLING (1960) entwickelte Ei-
Schutztest ist ein sehr guter Indikator, um die Herdenimmunität zu
prüfen (DORN und KRONTHALER, 1963; von BLOW et al., 1963). Um die
genaue Antikörpermenge der Muttertiere individuell nachzuweisen, müs-
sen embryonierte Eier mit steigenden Dosen von virulentem AE-Virus
infiziert werden. Dieses Verfahren kommt einem in vitro durchgeführten
Neutralisationstest mit mütterlichem Serum in seiner Genauigkeit sehr
nahe. Zur Untersuchung von ganzen Beständen hat sich aber eingebür-
gert, Eier mit einer festen Dosis (100 EID₅₀) zu belasten.

Nach einer kloakalen Impfung gegen die Infektiöse Laryngotracheitis
kann der Impferfolg durch die Impfreaktion ("take") beur-
teilt werden. Ödematöse Schwellung und katarrhalische, blutige oder
fibrinöse Schwellung der Schleimhaut gelten als Impferfolg (GRATZL
und KÜHLER, 1968). Neutralisierende Anti-
körper konnten HITCHNER et al. (1958) 1 Woche p. vacc. ermitteln.
Ihr Maximum erreichen sie 3 Wochen p. vacc. Größere Bedeutung bei
der Wirksamkeitsprüfung von Impfungen gegen ILT kommt jedoch der
Belastungsinfektion zu (SHIBLEY et al. 1962).

Seit der Einführung der kutanen Pockenschutzimpfung beim Geflügel
wird die Impfreaktion (Knötchen- oder Pustelbildung) durch Nach-
scha kontrolliert. Dabei kann der Erfolg der Impfung in einem
Bestand mit relativ kleinen Stichprobenzahlen gut beurteilt werden
(RUNDFELDT et al., 1968), denn die Vermehrung des Impfvirus an der Ap-
plikationsstelle ist ein brauchbarer Indikator für den resultierenden
Immunschutz. Bei individuellen Untersuchungen müssen aber spezifischere
Methoden benutzt werden. Der Nachweis von Serumantikörper
n gelingt nur in seltenen Fällen, da sie nur eine Teilerscheinung

im Komplex der aktiven Immunität gegen die Pockenerkrankungen darstellen (MAYR, 1959). Neutralisierende Antikörper erreichen nur eine geringe Höhe und dauern nur einige Wochen nach der Impfung an (WITTMANN und MAYR, 1960; BOSGRA und ROERINK, 1962). Auch nach ihrem Absinken ist meist noch eine gute Immunität vorhanden. Auch präzipitierende Antikörper treten nach der Pockenimpfung nicht regelmäßig auf. Ihre Bildung hängt stark vom Virulenzgrad des Impfvirus ab, außerdem auch vom Alter der Impflinge (WITTMANN, 1958).

Da bei den Pockenerkrankungen die zellulären Immunmechanismen vor den humoralen rangieren (MAYR, 1959), kommt bei der Wirksamkeitsprüfung von Impfungen der *Belastungsinfektion* besondere Bedeutung zu. Über die kutane bzw. intravenöse Infizierung lassen sich sowohl Hautschutz als auch zentral verankerte Immunität gut nachweisen. Dieses Verfahren hat sich auch bei Trinkwasserimpfungen bewährt. Beide Methoden stimmen in ihrem Ergebnis sehr gut überein (MAYR et al., 1971a, 1971b). Dabei muß die Virusdosis beim Challenge in einer Höhe gehalten werden, die nicht vakzinierter Kontrolltiere sicher erkranken läßt (RATH, 1971). Bei der kutanen Testinfizierung (Federfollikelmethode) erweisen sich immune Tiere als vollkommen unempfindlich, meist kommt es aber zur ausgeprägten Oberempfindlichkeitsreaktion (Schnellreaktion) die rasch und gutartig verläuft. Die Abhängigkeit der genannten Wirksamkeitsprüfung und ihrer Resultate vom verwendeten Challenge-Virusstamm, der dabei gewählten Virusdosis sowie dem Applikationsmodus sind bisher nicht untersucht worden.

Faßt man die Faktoren zusammen, die das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung variieren können, steht die *Prüfungsmethode* im Vordergrund. Bei fast allen Viruskrankheiten des Geflügels führt die Trinkwasserimpfung zum meßbaren Anstieg von Serum-Antikörpern, was im großen und ganzen als deutlicher Ausdruck einer entstandenen Immunität gewertet werden darf. Wenn die serologischen Untersuchungen auch bei einzelnen Impflingen zu falschen Ergebnissen führt, ist sie in vielen Fällen die einzige Methode, um den Immunstatus ganzer Bestände routinemäßig zu erfassen.

Für die Beobachtung des individuellen Impferfolges wie auch für die Prüfung neuer Vakzinen ist generell der Belastungsversuch durch Challengeinfektion notwendig. Er vermag die Diskrepanz zwischen serologischer Reaktion und tatsächlichem Immunschutz aufzudecken. Dabei sind jedoch einige Regeln von großer Wichtigkeit: Obwohl es auf die *A r t* und *V i r u l e n z* des zum Challenge verwendeten Virusstammes nicht primär ankommt (z.B. ob homolog oder heterolog zum Impfvirus), ist die eingesetzte *C h a l l e n g e d o s i s* entscheidend für das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung. Man muß hier zwischen der Sicherheit des Testes und realen Verhältnissen genau abwägen, um den Wert eines Impfstoffes objektiv zu messen. Ebenso wichtig ist die *R o u t e*, über die eine Belastungsinfektion vorgenommen wird. So kann ein intramuskulärer Challenge z.B. bei Newcastle Disease eine Immunität vortäuschen, während die aerogene Infizierung zur Erkrankung führt. Je mehr sich die Belastungsinfektion den natürlichen Infizierungsverhältnissen angleicht, desto genauer kann sie über den Wert der Impfung Auskunft geben.

Bei den Pocken ist eine Belastungsinfektion auch bei Routineuntersuchungen unerlässlich, da es bei der Impfung kaum zu humoral erfassbaren Immunmechanismen kommt.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten bei den hauseigenen Versuchen männliche Hybrid-Küken aus einem Bestand, in dem nicht gegen Hühnerpocken geimpft wird. Sie wurden als Eintagsküken eingestallt und in Bodenhaltung mit dem handelsüblichen Fertigfutter gruppenweise in getrennten Quarantäne-Ställen aufgezogen.

In einem Versuch (3.2.2) kam gleichzeitig eine Gruppe von Tieren zum Einsatz, deren Eltern gegen Hühnerpocken geimpft worden waren.

Ein weiterer Versuch (3.2.5) wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Kathmann, Calveslage, durchgeführt. Als Versuchstiere dienten hier weibliche, in Käfighaltung aufgezogene Hybrid-Küken.

3.1.2 Zellkulturen

Verwendung fanden primäre Zellkulturen aus Hühnerembryo-Fibroblasten (FHE). Sie wurden nach dem üblichen Verfahren (MAYR und KALCHER, 1960) aus 10 bis 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen mittels Trypsinandaung gewonnen (DULBECCO und VOGT, 1954). Das Anzuchtmedium bestand aus 83,5% Earle'scher Lösung, 5,0% fetalem Kälberserum, 10,0% Laktalbumin (hydrolysiert, 5%ige Lösung), 1,5% Phenolrot (in 0,1%iger Lösung), sowie 100 I.E. Penicillin und 100 µg Dihydrostreptomycin/ml.

Die Zellsuspensionen wurden zur Virusvermehrung in Kulturgefäße nach Roux und zur Virustitrierung in Kulturröhrchen eingesät. Als Erhaltung- und Virusmedium diente reine Rinderammonionflüssigkeit (RAF) mit Zusatz von 1,5 Prozent Phenolrot und der üblichen Menge von Antibiotika.

3.1.3 Virusstämme

Alle im Rahmen der Versuche vorgenommenen Schutzimpfungen sind mit dem in FHE-Zellkulturen attenuierten Hühnerpocken-Virusstamm HP-1 durchgeführt worden. Der Attenuierungsvorgang und die Eigenschaften des attenuierten Virus sind eingehend von MAYR und MALICKI (1966) beschrieben worden.

Zur Herstellung der Impfstoffe diente HP-1-Virus der 193. - 195., 269. - 272., 345. und 398. - 402. Passage als Saatvirus. Sein Infektiositätstiter betrug $10^{7,0}$ bis $10^{7,75}$ KID₅₀ (50% kulturinfektiöse Dosen) pro ml.

Als Testvirus für die Wirksamkeitsprüfungen (Challenge-Virus) wurde virulentes HP-1-Virus der 24. FHE-Passage bzw. der heterologe Hühnerpocken-Virusstamm Weesp II⁺, vorliegend als Hühnerhautverreibung, verwendet. Der Titer lag beim HP-1-Testvirus zwischen $10^{6,0}$ und $10^{7,0}$ EI-ID₅₀ (50% Ei-infektiöse Dosen), beim Weesp II - Virus zwischen $10^{7,0}$ und $10^{8,0}$ Ef-ID₅₀.

3.1.4 Virustitrierungen

+) Für die Überlassung dieses Teststammes sei Herrn Dr. H.J.G. ROERINK von der Firma Philips-Duphar, Weesp, Niederlande, herzlichst gedankt.

3.1.4.1 In FHE-Kulturen

Der Virusgehalt der Hühnerpocken-Impfstoffe wurde in FHE-Zellen ermittelt. Pro Verdünnungsstufe (in Zehnerpotenzen) einer Probe wurden 4 Kulturröhrchen mit je 0,1 ml beimpft. Verdünnungsmittel war Earle'sche Lösung. Die Endablesung anhand des cytopathischen Effekts (cpE) erfolgte am 7. Tag p.inf. (nach der Infizierung), die Virustiter wurden nach KARBER (1931) in KID_{50} (50% kulturinfektiösen Dosen) pro ml errechnet.

3.1.4.2 Im Brutei

Verdünnungsreihen und Verdünnungsmittel waren die gleichen wie bei Titrierungen in Zellkulturen. Von den einzelnen Virusverdünnungsstufen wurden 0,1 ml auf die gesenkte Chorioallantois-Membran (CAM) 10 bis 11 Tage vorbebrüteter Hühnereier (McCARTHY und DUMBELL, 1961) aus seuchenfreien Beständen verimpft. Die Berechnung erfolgte nach KARBER (1931) in $Ei-ID_{50}$ (50% Ei-infektiösen Dosen) am 6. oder 7. Tag p. inf. durch Auswertung der CAM.

3.1.5 Herstellung der Hühnerpockenimpfstoffe

Dicht gewachsenen FHE-Kulturen in Roux-Flaschen wurde nach Entfernung des Anzuchtmediums jeweils 10 ml unverdünntes HP-1-Saatvirus mit 90 ml Erhaltungsmedium (pro Gefäß) zugegeben. Nach Bebrütung bei 37°C wurde die gesamte Zellkultur (Medium und Zellphase) am Höhepunkt der Zellerstörung entnommen und auf bakterielle Kontamination geprüft. Zellgebundenes Virus wurde durch einmaliges Gefriertauen und eine anschließende Ultraschallbehandlung (30 Sekunden bei 50 Watt, Branson Sonifer B-12) freigesetzt. Die Virussuspension wurde dann 15 Minuten bei

3000 UpM zentrifugiert, der Oberstand in Portionen zu 10 ml (Titration) bzw. 50 bis 80 ml (Impfstoff) abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.1.6 Virulenzprüfungen von HP-Impfstoffen

Die Restvirulenz der über eine verschiedene Zahl von FHE-Passagen attenuierten HP-1-Impfviruschargen wurde an Eintagsküken geprüft. Pro Tier wurden 0,5 ml Impfvirus intravenös in die oberflächliche mediale Beinvene bzw. intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur injiziert (MAYR, 1960; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1962a, 1962b). Bei der nachfolgenden täglichen Untersuchung wurden generalisierte Pockenerkrankungen und Todesfälle registriert.

3.1.7 Durchführung der Impfungen

Sämtliche Impfungen gegen Hühnerpocken erfolgten per os. Die Impfvirussuspensionen wurden dem Trinkwasser beigemischt und in Kunststoffstülptränken (bei Versuch 3.2.5 in einem Tränkesystem mit Nippeltränken) angeboten. Jedes Tier nahm durchschnittlich 20 ml Impfstoff auf. Als vorbereitende Maßnahmen wurde den Tieren das Trinkwasser vor der Vakzination über Nacht bzw. 4 Stunden vorher entzogen (Ausnahme Versuch 3.2.5).

Das gleiche Verfahren fand bei der Vakzination gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bronchitis Anwendung. Der Marek-Impfstoff wurde gemäß Herstellervorschrift intramuskulär appliziert (Versuch 3.2.4.2).

3.1.8 Herstellung der Testvirussuspension

Die Vermehrung von virulentem HP-1-Testvirus entsprach der Gewinnung des Impfvirus.

Das Testvirus Weesp II wurde im Huhn vermehrt. Die Infizierung der Hühner erfolgte mittels Federfollikelmethode an beiden Unterschenkeln. Die Tiere wurden am Höhepunkt der Infektion getötet, die spezifisch veränderten Hautbezirke entnommen, grob zerkleinert und mit Zusatz von Glycerin bei -20° gelagert.

Erst unmittelbar vor der Testinfektion wurde das Hühnerhaut-Virusmaterial im Verhältnis 1:10 mit Earle'scher Lösung versetzt, im Ultraturrax homogenisiert, durch eine Ultraschallbehandlung zusätzlich aufgeschlossen (30 sec. bei 50 Watt; Branson Sonifer B-12) und 10 Minuten bei 2.000 Upm in der Zentrifuge geklärt.

Um eine möglichst große Virusausschüttung zu erhalten, wurde das zurückbleibende Sediment noch einmal der gleichen Aufbereitung unterzogen. Diese beiden Anteile zusammen bildeten das Testvirus-Ausgangsmaterial. Die Prüfung auf bakterielle Kontamination und der Zusatz von Antibiotika schlossen sich an.

3.1.9 Virulenzbestimmung der Testviren

Um einen Vergleich der Testvirusstämme HP-1 (24. FHE-Passage) und Weesp II am Huhn vornehmen zu können, wurden empfängliche Junghühner intravenös und kutan (über die Federfollikel des Unterschenkels) mit beiden Testviren infiziert. Das Alter dieser Tiere (ca. 8 Wochen) wurde mit den in den Versuchen geplanten Daten der Testinfektionen abgestimmt. Die Infektionsdosen wurden abgestuft, aber innerhalb einer Höhe gehalten, die bei allen Tieren noch zu einer Erkrankung an Hühnerpocken führt.

Die Beurteilung der Virulenz erfolgte nach intravenöser Infektion anhand der Stärke der generalisierenden Pockenerkrankung, d.h. der Qualität und Quantität von Veränderungen an Kamm, Kehllappen, Augengegend, Schnabel und Zunge sowie an den Extremitäten. Nach kutaner Infektion wurde die Beurteilung nach Zahl und Stärke der spezifischen Veränderungen an den Federfollikeln, der Reaktion der Haut, der Tendenz zur Heilung sowie dem zeitlichen Ablauf der Reaktionen vorgenommen. Auf eine Generalisierung bei diesen Tieren wurde ebenfalls geachtet.

3.1.10 Testinfektion der Hühner

Testinfektionen wurden zum Nachweis des Impferfolgs bei Impflingen und zur Kontrolle bei nicht geimpften Tieren kutan, intravenös und peroral durchgeführt.

Bei der kutanen Testinfektion zum Nachweis der Hautimmunität wurden die Hühner mittels Federfollikelmethode mit dem Testvirus infiziert. Die Einzeldosen wurden so eingestellt, daß beide Testviren bei den Kontrolltieren eine starke Pustelreaktion hervorriefen (siehe Versuch 3.2.1.1).

Zum Nachweis der zentralen Immunität wurde den Versuchstieren Testvirus intravenös in die Flügelvene verabreicht. Die Virusdosen wurden bei beiden Testvirusstämmen so abgestimmt, daß alle Kontrolltiere an generalisierenden Pocken erkrankten.

Bei der oralen Testinfektion zum Nachweis lokaler und zentraler Immunität wurde das Challenge-Virus, der virulente Hühnerpockenstamm Weesp II, über durchschnittlich 20 ml Trinkwasser pro Tier appliziert. Die Einzeldosis betrug dann $10^{8,0}$ Ei-ID₅₀ und führte bei Kontrolltieren zu einer generalisierenden Pockenerkrankung.

Die Reaktionen wurden bei allen Tieren täglich hinsichtlich einer lokalen oder generalisierenden Pockenbildung kontrolliert.

3.1.11 Bewertung der Wirksamkeitsprüfung

3.1.11.1 Nachweis einer Hautimmunität

Ausgewertet wurde die Reaktion der mittels Federfollikelmethode testinfizierten Hautfläche. Die Testvirusdosis war so eingestellt worden, daß bei Kontrolltieren die lokale Infektion zu 100 Prozent haftete und dabei im Schnitt 20 bis 30 Federfollikel mit einer Pustelbildung reagierten. Die lokale Hautreaktion der Impflinge wurde folgendermaßen bewertet:

1. Normale Pustelreaktion

An den infizierten Federfollikeln entwickelten sich echte Pusteln. Die Reaktionen begannen zwischen dem 4. und 5. Tag p. inf. mit Rötung und leichter Schwellung, erreichten zwischen dem 6. bis 9. Tag p. inf. ihren Höhepunkt in Form typisch ausgeprägter Pustelbildung mit entzündlicher Reaktion der Umgebung und bildeten sich in Form dicker Krusten langsam zurück. Die Abheilung dauerte bis zu 3 Wochen. Zwischen den einzelnen Reagenten bestanden qualitative Unterschiede nur insofern, als die Pustelreaktion das eine Mal sehr stark, das andere Mal gewebefreundlicher ausfiel und die Zahl der positiven Federfollikel leicht schwankte. Teilweise kam es auch zu Generalisierungen mit Pocken an den Schleimhäuten, Häuten des Kopfes und an den Extremitäten.

Beurteilung: nicht immun

2. Schnellreaktion: Die Schnellreaktion ist eine Oberempfindlichkeitsreaktion (Frühreaktion bei Wiederimpfungen im Sinne der Humanmedizin (HERRLICH, 1965), die sich von einer normalen Pustelreaktion zeitlich und qualitativ unterscheidet.

Es entwickelt sich eine Schwellung der infizierten Federfollikel. Sie setzt am 2. bis 3. Tag p. inf. ein, erreicht ihren Höhepunkt am 3. bis 5. Tag p. inf. mit starker Infiltrierung der Follikel und

ihrer Umgebung und ist schon am 6. Tag p. inf. vollkommen abgeklungen. Es kommt somit weder zur Pustelbildung noch zur Verkrustung der Follikel, sondern lediglich zur papelförmigen Proliferation.

Beurteilung: Hautimmunität

3. Keine Reaktion: Während der gesamten Beobachtungszeit bleibt die Infektionsstelle ohne Reaktion und es entwickelt sich keine generalisierende Pockenerkrankung.

Beurteilung: Hautimmunität

3.1.11.2 Nachweis einer zentralen Immunität

Ausgewertet wurde hier Ausbleiben oder Ausbildung einer generalisierenden Pockenerkrankung nach intravenöser Testinfektion. Jedes Auftreten von Pocken (Schleimhaut- oder Hautform) galt als Zeichen einer generalisierenden Erkrankung. Inkubationszeit, Dauer der Erkrankung, Anzahl und Ausprägung der Pusteln wurden hier bewußt nicht berücksichtigt. Bereits eine Pockeneruption galt als Zeichen fehlender Immunität.

Als immun zählten nur Tiere, bei denen nach der intravenösen Testinfektion keine Anzeichen einer Pockenerkrankung beobachtet werden konnte.

3.1.11.3 Kombinierter Nachweis von lokaler und zentraler Immunität

Hierzu diente die orale Testinfektion. Wie beim intravenösen Challenge wurden alle Tiere als nicht immun bezeichnet, die als Zeichen einer generalisierenden Pockenerkrankung Pusteln ausbildeten. Deren Fehlen zeigte die Immunität des Versuchstieres an.

3.1.12 Virusnachweis in Organ- bzw. Rachenspülproben

Im Versuch 3.2.3.2 wurden Küken zum Zweck eines Virusnachweises nach der Blutgewinnung über Herzpunktion getötet. Darm und Darminhalt samt Kloake, Leber, Milz und das Gewebe des Rachenraumes wurden unter sterilen Kautelen entnommen und getrennt verarbeitet. Nach Versetzung jeder Charge mit Earle'scher Lösung im Verhältnis 1:10 wurde das Material mit einem Ultraturrax homogenisiert, mit Ultraschall (Branson Sonifer B 12) 30 Sekunden bei 50 Watt aufgeschlossen, 20 Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert und der Oberstand für den Virusnachweis gewonnen.

Darmverreibungen erfuhren eine zusätzliche Behandlung. Der wie oben gewonnene Oberstand wurde 60 Minuten bei 20.000 Upm (Spinco L, Rotor 40) ultrazentrifugiert, das Sediment wieder in Earle'scher Lösung (10 Prozent des Ausgangsvolumens) suspendiert, anschließend 5 Minuten bei 1.200 Upm abzentrifugiert und der Oberstand aufbewahrt.

Alle Organsuspensionen wurden mit 1.000 I.E. Penicillin und 1 mg Dihydrostreptomycin pro ml versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

Rachenspülproben wurden gewonnen, indem den Tieren mittels Injektions-spritze mit aufgesetztem Plastikschlauch der gesamte Schnabel- und Rachenraum mit je 2 ml Earle'scher Lösung ausgespült wurde. Die aufgefangene Flüssigkeit wurden 10 Minuten bei 3.000 Upm zentrifugiert, der dann abpipettierte Oberstand mit 5 Prozent Kälberserum und Antibiotika versetzt und bei -20°C gelagert.

Der Virusnachweis aus den gewonnenen Materialien erfolgte in 10 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen auf der künstlich gesenkten CAM (vergl. 3.1.4.2).

3.1.13 Handels-Impfstoffe

Für das Impfprogramm im Versuch 2.5.2 wurden folgende handelsüblichen Vakzinen¹ eingesetzt: Marek-Disease-Vakzine (Putenherpesvirus), Impfstoffe gegen Infektiöse Bronchitis (IB-Resprovac I), sowie die Newcastle Disease-Vakzinen (Hitchner B1 und LaSota).

¹Die Impfstoffe wurden freundlicherweise von der Behringwerke AG., Marburg, zur Verfügung gestellt.

3.2 Versuche und Ergebnisse

Bei den experimentellen Untersuchungen sollten die Gesetzmäßigkeiten untersucht werden, die den Erfolg einer Trinkwasser-Impfung gegen Hühnerpocken von seiten des Impflings und des Impfstoffes beeinflussen.

Bezüglich des Impflings interessierte, ob die Impfung der Elternbestände sich unter Umständen negativ auf die Trinkwasser-Impfung junger Küken auswirkt.

Beim Impfstoff sollte geprüft werden, ob schwächer attenuiertes Virus zu stärkerer Immunität führt als das bisher benützte, hoch attenuierte HP-1-Virus der 400. FHE-Passage. Dabei mußte auch die Restvirulenz berücksichtigt werden. Weitere Versuche dienten dazu, auch bei schwächer attenuiertem HP-1-Virus die Unschädlichkeit der oralen Vakzination nachzuweisen und Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg herzustellen.

Um die Verträglichkeit und den Erfolg der peroralen Hühnerpocken-Impfung auch unter Praxisbedingungen nachzuweisen, wurden einerseits Versuchstiere, andererseits Zuchttiere eines Großbetriebs wiederholt im Rahmen des praxisüblichen Impfprogrammes über das Trinkwasser gegen Hühnerpocken vakziniert.

Da der Erfolg der Impfung durch das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung ausgedrückt wird, mußten zunächst diejenigen Faktoren beleuchtet werden, die hierbei von Bedeutung sind.

3.2.1 Einfluß von Challenge-Virus, -Dosis und -Modus auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpocken-Trinkwasservakzinen

In allen Untersuchungen von MAYR und Mitarbeitern (1971, 1972) zur Immunisierung gegen Hühnerpocken ist der Infektionsschutz über eine Belastungsinfektion mit dem vollvirulenten HP-1-Virus, also dem homologen Stamm, nachgewiesen worden.

In den eigenen Versuchen sollte geprüft werden, ob die über die Trinkwasserimpfung mit dem HP-1-Virus erzielte Immunität auch einer heterologen Belastungsinfektion standhält. Dazu wurden zuerst die klinischen Infektionsdosen des homologen und des heterologen Testvirusstammes vergleichend ausgetestet. Außerdem mußte geklärt werden, welchen Einfluß unterschiedliche Challengedosen sowie die bei der Testinfektion angewendeten Applikationsmodi auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung haben.

3.2.1.1 Einstellung der Testdosis bei den Stämmen HP-1 und Weesp II am Huhn

Um echte Vergleichsmöglichkeiten bei der Wirksamkeitsprüfung zu haben, mußte zunächst diejenige Virusmenge bestimmt werden, die bei empfänglichen Tieren nach intravenöser bzw. kutaner Infektion zu einem annähernd gleich schweren klinischen Erkrankungsbild führt.

Verwendet wurden HP-1-Virus der 24. FHE-Passage und Weesp II-Virus der 1. Münchener Hühnerhautpassage. Diese zwei Testvirusarten wurden je zwei Tieren in unterschiedlicher Konzentration einmal in die Flügelvene, zum anderen kutan mittels Federfollikelmethode verabreicht. Die Einzeldosen pro Tier betrugen bei der intravenösen Infektion $10^{6,5}$, $10^{5,5}$

Infektionsmodus	Menge ml	Dosis Ei-ID ₅₀	Testvirus	
			HP-1-Virus, 23. FHE-Passage	Weesp II, Hühnerhautverreibung
i.v.	1,0	$10^{6,5}$	ca. 100 - 200 teilweise konfluierende Pocken an Kamm und Kehllappen; stecknadelkopfgroß; einzelne Effloreszenzen an den Schleimhäuten und Extremitäten	nicht durchgeführt
i.v.	1,0	$10^{5,5}$	ca. 10 - 15 einzelne Pocken an Kamm und Kehllappen	konfluierende Pocken an Kamm und Kehllappen; starke Veränderungen an den Schleimhäuten des Kopfes und der Extremitäten
i.v.	1,0	$10^{4,5}$	nur vereinzelte (1 - 2) kleine Pocken an Kamm und Kehllappen	10 - 25 reiskorngroße dtl. abgesetzte Pocken an Kamm und Kehllappen
kutan	0,05	$10^{4,2}$	langsamere Anbildung; lokale, gut abgesetzte Primärpocken; wenig Beteiligung der Umgebung	rasche Anbildung; lokale konfluierende Pockenbildung; starke Beteiligung der Umgebung; Ödematisierung; Generalisierung
kutan	0,05	$10^{3,2}$	wenige Primärpocken; keine Beteiligung der Umgebung	langsamere Anbildung; gut abgesetzte, erbsengroße Primärpocken; wenig Beteiligung der Umgebung

Tab. 1: Virulenzvergleich der zwei Testvirusstämme HP-1 und Weesp II am Mühnerversuch

und $10^{4,5}$ Ei-ID₅₀ in 1 ml und bei der kutanen $10^{4,2}$ und $10^{3,2}$ Ei-ID₅₀ in 0,05 ml. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das Versuchsergebnis ließ sowohl bei intravenöser als auch bei kutaner Infektion eine stärkere Virulenz des Teststammes Weesp II gegenüber dem Stamm HP-1 erkennen. Bei gleicher Dosierung löste der Stamm Weesp II über beide Infektionswege viel schwerere Pockenerkrankung aus als der Stamm HP-1. Wurde das Weesp II-Virus jedoch in 10-fach geringerer Dosis als das HP-1-Virus verabreicht, resultierten annähernd gleich starke Krankheitserscheinungen. Im folgenden Versuch wurde dieser Tatsache Rechnung getragen und die Testvirusdosis entsprechend eingestellt.

3.2.1.2 Einfluß verschiedener Challenge-Virusstämme auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung

Der Versuch sollte beantworten, ob Hühner nach einheitlicher Vakzinierung über das Trinkwasser gegenüber einem heterologen Hühnerpockenvirus-Stamm ebenso gut geschützt sind wie gegenüber dem homologen Virus.

Fünzig Küken wurden im Alter von 5 und 26 Tagen mit HP-1-Virus der 400. FHE-Passage in gleichen Einzeldosen (je $10^{7,0}$ KID₅₀) über das Trinkwasser vakzinisiert. Kontrolltiere in getrennten Ställen blieben ungeimpft. Am 54. Tag erfolgte bei allen Tieren die Testinfektion mit dem homologen HP-1- bzw. heterologen Weesp II-Virus. Dazu wurden 4 Gruppen gebildet: Gruppe 1 (27 Impflinge) sowie Gruppe 2 (18 Kontrollküken) bekamen Weesp II-Virus verabreicht, Gruppe 3 (23 Impflinge) und Gruppe 4 (19 Kontrollen) wurden mit HP-1-Testvirus infiziert. Jede Gruppe wurde zur kutanen bzw. intravenösen Infizierung unterteilt. Die Versuchsanordnung enthält Tabelle 2.

Alle mit Weesp II- oder HP-1-Virus intravenös infizierten Kontrollen (Einzeldosis $10^{4,5}$ bzw. $10^{5,5}$ Ei-ID₅₀) erkrankten an generalisierenden Pocken unter Bildung einzelner Pusteln an Haut und Schleimhäuten des Kopfes. Alle kutan infizierten Kontrolltiere (Einzeldosis bei Weesp II $10^{3,2}$, bei HP-1 $10^{4,2}$ Ei-ID₅₀) bildeten eine deutliche Pustelreaktion an der

	Gruppe	Impfvirus	Erstimpfung		Zweitimpfung		Testinfektion	
			Alter der Tiere (Tage)	Einzel- dosis (KID ₅₀)	Alter der Tiere (Tage)	Einzel- dosis (KID ₅₀)	Alter der Tiere (Tage)	Virus
1	geimpft	400.	5	10 ^{7,0}	26	10 ^{7,0}	54	HP-1
2	Kontrollen	-	-	-	-	-	54	HP-1
3	geimpft	400.	5	10 ^{7,0}	26	10 ^{7,0}	54	Weesp II
4	Kontrollen	-	-	-	-	-	54	Weesp II

Tabelle 2: Übersicht über die Anordnung des Versuches zur Belastungsinfektion von einheitlich über das Trinkwasser vakzinieren Kühen mit homologem und heterologem Testvirus

Gruppe	Testinfektion			Immunität	
	Virus	Dosis (Ei-ID ₅₀)		zentral	Haut
		i. v.	kutan		
1	Weesp II	10 ^{4,5}	10 ^{3,2}	8 / 13 (61%)	7 / 14 (50%)
2	Weesp II	10 ^{4,5}	10 ^{3,2}	0 / 10 (0%)	0 / 8 (0%)
3	HP-1	10 ^{5,5}	10 ^{4,2}	9 / 12 (75%)	8 / 11 (73%)
4	HP-1	10 ^{5,8}	10 ^{4,2}	0 / 10 (0%)	0 / 9 (0%)

Tabelle 3: Infektionsschutz (zentrale Immunität und Hautimmunität) zweifach über das Trinkwasser vakzinierter Küken gegenüber dem homologen und heterologen Testvirusstamm

Infektionsstelle aus.

Von den Impfungen der Gruppe 1 erwiesen sich 8 von 13 gegenüber der intravenösen und 7 von 14 gegenüber der kutanen Testinfektion mit dem Weesp II-Virus geschützt.

Bei den Küken der Gruppe 3 zeigten 9 von 12 eine zentral verankerte Immunität und 8 von 11 einen lokalen Hautschutz gegenüber dem Challenge mit HP-1-Testvirus. Die nicht immunen Tiere der Versuchsgruppen 1 und 3 bildeten nach intravenöser Injektion eine generalisierende Pockenerkrankung mit einzelnen Effloreszenzen an Haut und Schleimhaut des Kopfes, nach kutaner Belastungsinfektion einzelne Primärpocken aus. Eine Übersicht über die Versuchsergebnisse gibt die Tabelle 3.

3.2.1.3 Einfluß der Testvirusdosis auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung

Nachdem die Wirksamkeitsprüfung einer Trinkwasserimpfung bei abgestimmter Belastungsinfektion mit zwei verschiedenen, virulenten Hühnerpocken-Virusstämmen relativ einheitliche Ergebnisse erbracht hatte, sollte im folgenden Versuch geprüft werden, welchen Einfluß unterschiedlich hohe Testvirusdosen auf das Challenge-Ergebnis hatten.

Zur Trinkwasserimpfung diente wieder das attenuierte Hühnerpockenvirus, Stamm HP-1, der 400. FHE-Passage. Es wurde zwei Tiergruppen (1 und 3) im Alter von 5 und 26 Tagen zweimal in gleich hohen Einzeldosen ($10^{7,0} \text{KID}_{50}$) über das Trinkwasser verabreicht.

Alle Impfungen sowie gleichaltrige, ungeimpfte Kontrollen wurden im Alter von 54 Tagen (4 Wochen p. revacc.) mit dem virulenten, heterologen Hühnerpocken-Virusstamm Weesp II in unterschiedlichen Dosierungen testinfiziert. Über die genaue Versuchsanordnung gibt die Tabelle 4 Auskunft.

Gruppe	Zweifache Impfung			Testinfektion			
	Alter der Tiere (Tage)	Virus (FHE-Pass.)	Einzelosis (KID ₅₀)	Alter der Tiere (Tage)	Virus	Modus	Dosis (E1-ID ₅₀)
1 geimpft	5 und 26	400.	10 ^{7,0}	54	Weesp II	i.v. kutan	i.v.: 10 ^{4,5}
2 Kontrollen	-	-	-	54	Weesp II	i.v. kutan	kutan: 10 ^{3,2}
3 geimpft	5 und 26	400.	10 ^{7,0}	54	Weesp II	i.v. kutan	i.v.: 10 ^{5,5}
4 Kontrollen	-	-	-	54	Weesp II	i.v. kutan	kutan: 10 ^{4,2}

Tabelle 4: Versuchsanordnung zur Wirksamkeitsprüfung mit unterschiedlich hohen Belastungsinfektionen.

Von den Versuchs- bzw. Kontrollgruppen 1 und 2 wurde jeweils die Hälfte der Tiere intravenös und kutan mit derjenigen Dosis von Weesp II-Virus testinfiziert, die in Vorversuchen (3.2.11) zur Bildung multipler, aber deutlich abgesetzter Pocken geführt hatte und sich im Versuch 3.2.1.3 als geeignet für Wirksamkeitstests erwiesen hatte.

In den Gruppen 3 und 4 wurden die Testvirusdosen 10-fach höher eingestellt. Die Ergebnisse der Testinfektion sind in der Tabelle 5 wiedergegeben.

Die Küken der Kontrollgruppe 2 erkrankten nach intravenöser Belastung (Einzeldosis $10^{4,5}$ Ei-ID₅₀) generalisiert an Pocken mit ausgeprägter Pustelbildung an Kamm und Kehllappen. Nach kutaner Infizierung mit einer Einzeldosis von $10^{3,2}$ Ei-ID₅₀ bildeten sich einzelne Primärpocken an der Infektionsstelle aus. Bei den Küken der Gruppe 1, die zweimal über das Trinkwasser geimpft worden waren, erkrankten nach intravenöser Belastung 5 von 13 Tieren generalisiert, während sich 8 als immun erwiesen. Nach kutaner Infizierung entwickelten sich bei 7 von 14 Küken Pustelreaktionen, 7 Tiere konnten aufgrund einer Schnellreaktion als immun bezeichnet werden.

Die zehnfach stärkere Test-Dosis ließ die Tiere der Kontrollgruppe 4 entsprechend schwer erkranken (vergl. Tabelle 1). Diese Virusdosis durchbrach die Immunität bei allen Impfingen der Gruppe 3. Alle intravenös (Einzeldosis $10^{5,5}$ Ei-ID₅₀) infizierten Impflinge erkrankten wie die Kontrollen an einer schweren, generalisierend verlaufenden Pockenform mit konfluierenden Effloreszenzen an Haut und Schleimhäuten des Kopfes und an den Extremitäten. An der kutanen Infizierungsstelle (Testdosis $10^{4,2}$ Ei-ID₅₀) entwickelten sich bei allen Tieren rasch lokale, konfluierende Primärpocken, die auch die Umgebung stark infiltrierten und anschließend verkrusteten. Es kam bei einem Teil der kutan testinfizierten Kontrolltiere zu sekundären Pockenpusteln an Kamm und Kehllappen, nicht aber bei den Impfingen.

Gruppe	Zweifache Impfung	Testinfektion							Immunitätsrate immun / insgesamt	
		Anzahl der Tiere	Modus	Dosis (Ei- ID ₅₀)	nega- tiv	genera- lisiert	Schnell- reaktion	Pustel- reaktion	Zentral	Haut
1 geimpft	10 ^{7,0}	13	i.v.	10 ^{4,5}	8	5	-	-	8/13 (61%)	-
		14	kutan	10 ^{3,2}	-	-	7	7	-	7/14 (50%)
2 Kontrollen	-	10	i.v.	10 ^{4,5}	-	10	-	-	0/10 (0%)	-
		8	kutan	10 ^{3,2}	-	-	-	8	-	0/8 (0%)
3 geimpft	10 ^{7,0}	10	i.v.	10 ^{5,5}	-	10	-	-	0/10 (0%)	-
		5	kutan	10 ^{4,2}	-	-	-	5	-	0/5 (0%)
4 Kontrollen	-	10	i.v.	10 ^{5,5}	-	10	-	-	0/10 (0%)	-
		5	kutan	10 ^{4,2}	-	3	-	5	-	0/5 (0%)

Tabelle 5: Ergebnisse einer Immunitätsprüfung gleichartig vakzinierter Küken durch unterschiedlich starke Belastungsinfektion

3.2.1.4 Einfluß des Challengemodus auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung

In allen bisherigen Versuchen war der Erfolg einer Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken durch eine Belastungsinfektion mit virulentem Hühnerpocken-Virus geprüft worden. Beim getrennt durchgeführten Nachweis der lokalen Hautimmunität (kutaner Challenge) und des zentral verankerten Schutzes (intravenöser Challenge) hatten sich stets übereinstimmende Werte gegeben. Es sollte nun geprüft werden, ob die verwendeten "künstlichen" Testmethoden exakte Auskunft über den praktischen Immunstatus geben können. Im folgenden Versuch wurde daher die Belastungsinfektion neben der intravenösen Methode auch per os vorgenommen.

Vier verschiedene Tiergruppen wurden jeweils im Alter von 10 und 35 Tagen mit unterschiedlich hohen Dosen des über 272/273 Passagen in FHE-Kulturen attenuierten HP-1-Virus geimpft. Die Einzeldosen pro Tier und Impfung betrugen in den einzelnen Gruppen $10^{7,0}/10^{7,5}$, $10^{6,0}/10^{6,5}$, $10^{5,0}/10^{5,5}$ bzw. $10^{4,0}/10^{4,5}$ KID₅₀ (Erstimpfung/Zweitimpfung). Die Impfung erwies sich für alle Impflinge als unschädlich. Es wurden keine Abweichungen im Allgemeinbefinden oder in der Gewichtsentwicklung der Küken festgestellt.

Vier Wochen nach der Zweitimpfung wurde der Impferfolg in jeder Impfgruppe durch orale Belastungsinfektion (Trinkwasserinfektion) mit dem heterologen Hühnerpocken-Virusstamm Weesp II und durch intravenöse Gabe des HP-1-Testvirus geprüft. Beim per os-Challenge betrug die verabreichte Einzeldosis $10^{8,0}$ Ei-ID₅₀. Diese Virusmenge hatte sich in Vorversuchen als notwendig erwiesen, um eine generalisierende Pockenerkrankung mit multipler Pustelbildung an Haut und Schleimhaut des Kopfes zu erzeugen. Vier Stunden vor der Infektion wurde diesen Tieren das Trinkwasser entzogen. Intravenös wurden pro Tier $10^{5,5}$ Ei-ID₅₀ des HP-1-Testvirus verabreicht. Nicht geimpfte, gleichaltrige Kontrolltiere erfuhren dieselbe Behandlung. Die Versuchsanordnung enthält die Tabelle 6, die Ergebnisse sind in der Tabelle 7 zusammengestellt.

Gruppe	Impfung			Testinfektion				
	Alter der Tiere i. Tage	Einzeldosis (KID ₅₀)		Alter der Tiere i. Tage	oral		intravenös	
		Erstimpfung	Zweitimpfung		Virus	Dosis (Ei-ID ₅₀)	Virus	Dosis (Ei-ID ₅₀)
Kontrollen	-	-	-	63	Weesp-II	10 ^{8,0}	HP-1-Virus	10 ^{5,5}
1	10 u. 35	10 ^{7,0}	10 ^{7,5}	"	"	"	"	"
2	"	10 ^{6,0}	10 ^{6,5}	"	"	"	"	"
3	"	10 ^{5,0}	10 ^{5,5}	"	"	"	"	"
4	"	10 ^{4,0}	10 ^{4,5}	"	"	"	"	"

Tabelle 6: Anordnung der Untersuchungen über den Einfluß des Challenge-modus auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpocken-Trinkwasservakzinen

Gruppe	Impfung		Infektions- weg	Testinfektion			Immunitätsrate
	Einzeldosis (KID ₅₀)			Tierzahl			
	Erst- impfung	Zweit- impfung		insge- samt	immun	nicht immun	
Kontrollen	-	-	oral	17	0	17	immun / insgesamt (zentral) 0 / 17 (0%)
			i.v.	14	0	14	0 / 14 (0%)
1	10 ^{7,0}	10 ^{7,5}	oral	8	7	1	7 / 8 (88%)
			i.v.	11	10	1	10/ 11 (91%)
2	10 ^{6,0}	10 ^{6,5}	oral	8	4	4	4 / 8 (50%)
			i.v.	11	6	5	6 / 11 (54%)
3	10 ^{5,0}	10 ^{5,5}	oral	8	2	6	2 / 8 (25%)
			i.v.	11	3	8	3 / 11 (27%)
4	10 ^{4,0}	10 ^{4,5}	oral	8	0	8	0 / 8 (0%)
			i.v.	11	1	10	1 / 11 (9%)

Tabelle 7: Ergebnisse der oralen und intravenösen Belastungsinfektion von Küken nach Trinkwasserimpfung mit unterschiedlichen Impfdosen.

Die Belastungsinfektion erwies sich als sehr stark. Die Kontrolltiere erkrankten sowohl nach oraler als auch intravenöser Infizierung am 7. bis 9. Tag p. inf. generalisiert mit zahlreichen Pockenpusteln an Haut und Schleimhaut des Kopfes.

In der 1. Gruppe (Einzeldosis pro Impfung $10^{7,0}/10^{7,5}$ KID₅₀), entwickelten nur je 1 von 8 bzw. von 11 Tieren nach oraler bzw. intravenöser Infektion einzelne Pocken am Kamm. Die zehnfach geringere Impfdosis bei der Gruppe 2 (Dosis pro Impfung $10^{6,0}/10^{6,5}$ KID₅₀) führte noch bei 4 von 8 oral bzw. 6 von 11 intravenös getesteten Tieren zu einem ausreichenden Schutz. Der Rest erkrankte mit einzelnen Pocken am Kamm oder Auge. In der Gruppe 3 (Dosis pro Impfung und Tier $10^{5,0}/10^{5,5}$ KID₅₀) widerstanden nur 2 von 8 oral bzw. 3 von 11 intravenös belasteten Tieren der Challengeinfektion. In der Gruppe 4 (Dosis $10^{4,0}/10^{4,5}$ KID₅₀) erkrankten alle Tier nach der oralen Testinfektion. Nur 1 von 11 Küken zeigte sich nach intravenöser Infektion geschützt.

Der Versuch demonstrierte somit an vier unterschiedlich vakzinieren Tiergruppen eine Obereinstimmung zwischen den Testinfektionen auf intravenösem und oralem Wege.

3.2.2 Der Einfluß des maternalen Impfstatus auf den Erfolg der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung bei Küken

Küken ließen sich schon im Alter von fünf Tagen erfolgreich über das Trinkwasser gegen Hühnerpocken immunisieren wenn sie im Abstand von einigen Wochen revakzinieren wurden (MAYR et al. 1971a, b; DANNER und MAYR, 1972). Die dabei verwendeten Küken stammten aus einem Bestand, in dem nicht gegen Hühnerpocken geimpft wurde. Mit einem maternalen Schutz der Küken gegen Hühnerpocken brauchte nicht gerechnet zu werden.

Wie bei anderen Infektionen scheint aber auch bei den Hühnerpocken eine Immunität der Muttertiere passiv auf die Küken übertragen zu werden (BOSGRA und ROERINK, 1962). In einem Versuch sollte geprüft werden, ob sich junge Küken aus einem Bestand, in dem die Elterntiere herkömmlich gegen Hühnerpocken vakziniert wurden (Gruppen B), schlechter immunisieren lassen als Tiere aus einem nicht geimpften Betrieb (Gruppen A). Dabei interessierte, ob sich unter solchen Voraussetzungen der Impferfolg durch unterschiedliche Impfverfahren (oral bzw. kutan) variieren läßt.

Dazu wurden die Küken der Gruppen A 1 und B 1 zweimal im Alter von 3 und 9 Tagen über das Trinkwasser mit dem Hühnerpockenstamm HP-1, 399. Passage, mit einer Einzeldosis von $10^{8,3}/10^{8,0}$ KID₅₀ (Erst-/Zweitimpfung vakziniert.

Die Tiere der Gruppen A 2 und B 2 bekamen denselben Impfstoff (Viruskonzentration $10^{7,3}/10^{7,0}$ KID₅₀ pro ml) im selben Alter ebenfalls zweimal mittels Doppelnaedel kutan verabreicht (wing-web-Methode). Kontrolltiere aus beiden Beständen (A und B) blieben ungeimpft in getrennten Stallungen. Über die Versuchsanordnung gibt Tabelle 8 Auskunft.

Vier Wochen nach der Zweitimpfung wurde bei Impfingen und Kontrolltieren eine intravenöse bzw. kutane Testinfektion mit dem HP-1-Testvirus durchgeführt. Die intravenös gegebene Einzeldosis betrug $10^{6,0}$, die kutane etwa $10^{4,7}$ KID₅₀. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengestellt.

Nach der Testinfektion erkrankten alle nicht geimpften Kontrolltiere generalisiert bzw. unter lokalen Pockenerscheinungen. In der Versuchsgruppe A 1 (orale Impfung von Küken nicht geimpfter Eltern) zeigten sich alle 22 intravenös infizierten Tiere und 21 von 23 kutan getesteten Hühner immun. Bei keinem dieser Challengemodi erkrankten Tiere der Gruppe A 2 (wing-web Impfung).

Versuchstiere		Erstimpfung				Zweitimpfung				Testinfektion			
Gruppe	Herkunft	Impfvirus FHE-Pg.	Alter (Tage)	Modus	Dosis (KID ₅₀)	Alter (Tage)	Modus	Dosis (KID ₅₀)	Alter (Tage)	Virus	Modus	Dosis (KID ₅₀)	
A	Kontroll- un-geimpfter Bestand	-	-	-	-	-	-	-	31	HP-1, 23.P.	i.v., kutan		
	1	un-geimpfter Bestand	399.	5	oral	10 ^{8,3}	9	oral	10 ^{8,0}	"	i.v., kutan		
	2	un-geimpfter Bestand	399.	5	kutan	10 ^{7,3} /ml	9	kutan	10 ^{7,0} /ml	"	i.v., kutan	i.v.: 10 ^{6,0}	
B	Kontroll- geimpfter Bestand	-	-	-	-	-	-	-	31	"	i.v., kutan	kutan: 10 ^{4,7}	
	1	geimpfter Bestand	399.	5	oral	10 ^{8,3}	9	oral	10 ^{8,0}	"	i.v., kutan		
	2	geimpfter Bestand	399.	5	kutan	10 ^{7,3} /ml	9	kutan	10 ^{7,0} /ml	"	i.v., kutan		

Tabelle 8: Versuchsanordnung zur Hühnerpocken-Schutzimpfung von Küken aus Hühnerpocken-geimpften und nicht geimpften Beständen

Gruppe	Testinfektion						Immunitätsrate (immun/insgesamt)	
	Zahl der Tiere	Modus	negativ	generalisiert	Pustelreakt.	Schnellreakt.	zentral	Haut
A ungeimpfter Bestand	Kontrollen	i.v.	0	18	-	-	0 / 18 (0%)	-
	18	kutan	0	0	18	0	-	0 / 18 (0%)
	22	i.v.	22	0	-	-	22/22 (100%)	-
	23	kutan	1	0	2	20	-	21/23 (92%)
	20	i.v.	20	0	-	-	20/20 (100%)	-
B geimpfter Bestand	21	kutan	0	0	0	21	-	21/21 (100%)
	Kontrollen	i.v.	0	16	-	-	0 / 16 (0%)	-
	16	kutan	0	0	16	0	-	0/16 (0%)
	22	i.v.	15	7	-	-	15/22 (68%)	-
	21	kutan	0	(1)	8	13	-	13/21 (62%)
	20	i.v.	17	3	-	-	17/20 (85%)	-
	22	kutan	1	0	0	21	-	22/22 (100%)

Tabelle 9: Überblick über die Wirksamkeit einer peroralen und einer kutanen Hühnerpockenimpfung von Küken aus Hühnerpocken-geimpften und nicht geimpften Beständen.

Von den Küken aus geimpften Beständen wieser nach peroraler Vakzination (Gruppe B 1) 15 von 22 einen zentralen bzw. 13 von 21 Tieren, einen lokalen Schutz auf. Nach kutaner Impfung (Gruppe B 2) entwickelten 17 von 20 Tieren einen intravenös belastbaren Schutz. Die Hautimmunität war bei allen 22 getesteten Tieren dieser Versuchsgruppe, ausgeprägt.

3.2.3 Beziehungen zwischen Attenuierungsgrad des Impfvirus, Virulenz für Eintagsküken und Eignung für die Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken

Für die perorale Immunisierung gegen Hühnerpocken hat sich das attenuierte HP-1-Virus auf dem Niveau der 400. FHE-Passage bewährt. Es ist avirulent und damit als Impfstoff vollkommen unschädlich (MAYR et al., 1971a, 1971b). Seine immunisierende Wirksamkeit hängt aber in hohem Maße von der Virusmenge ab, die bei der Impfung verabreicht wird. Die Impfdosis muß bei zweimaliger Gabe zwischen $10^{7,0}$ und $10^{8,0}$ KID₅₀ pro Tier und Impfung betragen, wenn ein guter Impfschutz erreicht werden soll (DANNER und MAYR, 1972). Daher interessierte, ob sich die Impfdosis bei Verwendung von weniger stark attenuiertem HP-1-Virus senken läßt. Ein solches Vorgehen erforderte jedoch zunächst die Prüfung der eingesetzten Impfviruschargen auf ihre Restvirulenz.

Ein weiterer Versuch diente dazu, die Unschädlichkeit des lediglich über 194 FHE-Passagen attenuierten HP-1-Virus bei der Verabreichung im Trinkwasser in extrem hohen Dosen festzustellen. Außer der klinischen Verträglichkeit interessierte vor allem, ob, wann, auf welchem Wege und in welcher Menge das Virus vom Impfling ausgeschieden wird und welche Wirkung es auf empfängliche Kontakttiere hat.

3.2.3.1 Prüfung des Impfvirus auf Restvirulenz im Eintagsküken

In 4 Versuchsgruppen wurde verschieden stark attenuiertes HP-1-Impfvirus

Virus		Virulenz		
Passage in FHE-Kultur	Infektionsdosis (KID ₅₀)	Generalisierung		Mortalität
		Zahl der Tiere erkrankt/infiziert	Zahl der Tiere Tod/infiziert	
196.	$10^{4,5}$	i_v 10 / 10	i_m 8 / 10	i_v 7 / 10 i_m 1 / 10
271.	"	9 / 10	8 / 10	0 / 10 0 / 10
347.	"	10 / 10	6 / 10	0 / 10 0 / 10
403.	"	0 / 10	0 / 10	0 / 10 0 / 10

Tabelle 10: Prüfung von HP-1-Virus unterschiedlicher
Attenuierung im Eintagsküken auf
Restvirulenz

je 10 Eintagsküken intravenös bzw. intramuskulär verabreicht, und zwar Virus der 196., 271., 347. und 403. Passage in FHE-Kulturen. Die Einzeldosis betrug pro Tier bei beiden Infektionsmodi $10^{4,5}$ KID₅₀. Die Tabelle 10 gibt einen Überblick über die Versuchsanordnung und die Ergebnisse.

Alle Tiere, die Virus der 403. FHE-Passage erhalten hatten blieben gesund. In den Testgruppen der 196., 271. und 347. Passage erkrankten die meisten Tiere zwischen dem 7. und 11. Tag p. inf. Es traten neben schweren Allgemeinstörungen pockenartige Effloreszenzen im Gebiet der Augen, des Schnabels und der Mundschleimhaut sowie an den Extremitäten auf. Unterschiede im Grad der Erkrankung sowie in ihrer Heilungstendenz bestanden zwischen den einzelnen Gruppen nicht.

Von der Tiergruppe, die HP-1-Virus der 196. Passage erhalten hatten, starben 7 von 10 Tieren nach intravenöser und eines von 10 nach intramuskulärer Infizierung, während Virus der 271. und 347. Passage nicht zu Todesfällen führte.

3.2.3.2 Unschädlichkeit des HP-1-Impfvirus der 194. FHE-Passage bei Applikation mit dem Trinkwasser

Die intravenöse und intramuskuläre Infizierung von Eintagsküken ist eine sehr strenge Methode zur Virulenzprüfung von Hühnerpockenvirus. Der absolute Charakter dieses Tests entspricht aber nicht den praktischen Verhältnissen bei einer Trinkwasserimpfung. Hier ist es richtig, die Unschädlichkeit des Impfvirus beim angewendeten Applikationsmodus zu bestimmen. Für die entsprechenden Untersuchungen wurde HP-1-Impfvirus der 194. Passage verwendet. Es interessierte die klinische Verträglichkeit bei höherer Dosierung, eine eventuelle Virusvermehrung im Impfling, eine mögliche Virusausscheidung und die Frage der Kontagiosität für empfängliche Kontakttiere.

Eine Gruppe von 50 Tieren wurde im Alter von 5 Tagen mit der hohen Einzeldosis von $10^{8,5}$ KID₅₀ des HP-1-Virus der 194. FHE-Passage oral vakziniert. Zu dieser Gruppe setzte man am Tag nach der Impfung 10 Kontakttiere.

Weder bei den Impflingen noch bei den Kontakttieren konnten in der darauf folgenden Beobachtungszeit irgendwelche klinischen Erscheinungen, die auf eine Impferkrankung hindeuteten, beobachtet werden. Der Allgemeinzustand und die Gewichtsentwicklung unterschieden sich nicht von den Kontrolltieren.

An einem Teil der Impflinge sollte festgestellt werden, wie sich das Impfvirus im Impfling verhält. Dazu wurden jeweils von 2 Tieren vor der Vakzination, unmittelbar nach der Impfung und dann 3, 6, 13, 23, 35 Stunden, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 12 Tage nach peroraler Virusverabreichung Blut, Rachenring, Leber und Milz sowie Darm und Darminhalt samt Kloake gewonnen. Daneben erfolgten am 1. (23 Stunden), 2., 3., 4., 6., 8. und 9. Tag p. inf. Rachenspülungen. Alle Proben wurden auf HP-1-Virus untersucht. Die Ergebnisse enthält die Tabelle 11.

Während der Trinkwasserimpfung ließ sich im Rachengewebe, im Blut und den inneren Organen HP-1-Virus nachweisen. Es verschwand aber wieder nach spätestens 13 Stunden (Rachenring) bzw. 35 Stunden (Blut, Leber, Milz). Nur aus dem Gewebe des Rachenraumes konnte 3 bis 7 Tage nach oraler Impfung erneut Virus rückisoliert werden. Auch die Rachenspülproben waren in dieser Zeit positiv. Keine der virushaltigen Proben enthielt mehr als 10^2 Ei-ID₅₀ des HP-1-Virus pro Gramm. Alle Versuche, HP-1-Virus aus Darm, Darminhalt und Kloake zu isolieren, verliefen negativ.

Pathologisch-anatomisch konnten bei keinem der seziierten Impflinge Veränderungen diagnostiziert werden, die auf eine Hühnerpockenimpfung hinwiesen.

Die Küken, die den vakzinierten Tieren am Tag nach der Impfung beige-setzt worden waren, erwiesen sich 4 Wochen nach dem Impftermin bei einer Testinfektion mit virulentem HP-1-Virus als voll empfänglich.

Untersuchungs- material	Virusisolierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung																
	0 h ¹	3 h	6 h ²	9 h	13h	23 h	35 h	2 T.	3 T.	4 T.	5 T.	6 T.	7 T.	8 T.	9 T.	10 T.	12 T.
Blut	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber, Milz	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Darm und Darminhalt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rachenring	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Rachenspül- proben	n.d. ³	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.	-	+	+	n.d.	+	n.d.	-	-	n.d.	n.d.

¹: Vor der Impfung

²: Zu diesem Zeitpunkt wurde die Trinkwasservakzine abgesetzt

³: nicht durchgeführt

- = negativer Virusnachweis

+ = Virusgehalt bis zu einer Höhe von 10^2 Ei-ID₅₀ / pro Gramm

Tabelle 11: Verhalten des HP-1-Virus, 194. FHE-Passage, im Küken nach Aufnahme von $10^{8,5}$ KID₅₀ über das Trinkwasser

3.2.3.3 Immunogene Wirksamkeit von unterschiedlich stark attenuiertem HP-1-Virus bei der Trinkwasservakzinierung

In einer Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob weniger stark attenuiertes HP-1-Virus eine höhere Immunogenität besitzt und den gewünschten Impferfolg schon in geringerer Dosis erzielt als das hochgradig attenuierte Virus der 401. FHE-Passage.

In acht getrennten Versuchsgruppen wurden Küken zweimal im Alter von 5 und 26 Tagen über das Trinkwasser gegen Hühnerpocken geimpft. Als Impfstoff diente

in den Gruppen 1A und 1B das HP-1-Virus der 194.,

in den Gruppen 2A und 2B das HP-1-Virus der 269.,

in den Gruppen 3A und 3B das HP-1-Virus der 346. und

in den Gruppen 4A und 4B das HP-1-Virus der 401. Passage.

Die Einzeldosen betrugen in den A-Untergruppen pro Tier $10^{7,03}$ und $10^{7,7}$ KID₅₀ und in den B-Untergruppen jeweils die zehnfach niedrigere Dosis. Der Impfplan ist in der Tabelle 12 niedergelegt.

Vier Wochen nach der Revakzination erfolgte bei allen Versuchstieren und bei nicht geimpften, gleichaltrigen Kontrollen die Testinfektion mit virulentem Hühnerpocken-Virus, Stamm Weesp II (Einzeldosis intravenös $10^{4,5}$, kutan $10^{3,2}$ Ei-ID₅₀).

Auch in diesen Versuchen erwies sich der Impfstamm HP-1 in der 194. bis 401. FHE-Passage als vollkommen unschädlich. Keines der 225 geimpften Tiere zeigte eine Impferkrankung oder irgendwelche sonstige Störungen. Das Allgemeinbefinden und auch die Gewichtsentwicklung entsprachen denen der Kontrollen.

Bei der Belastungsinfektion erkrankten die nicht geimpften Kontrolltiere nach intravenöser Infektion in allen Fällen generalisiert an Pocken mit zahlreichen Effloreszenzen an Haut und Schleimhaut des Kopfes. Die Reaktion auf die kutane Infektion bestand in starker Pustelbildung. Drei von den 18 kutan infizierten Tieren zeigten zudem eine generalisierende Pockenerkrankung.

Gruppe	Erstimpfung		Zweitimpfung		Testinfektion			
	Impfvirus	Alter i. Tagen	Einzelosis (KID ₅₀)	Alter i. Tagen	Einzelosis (KID ₅₀)	Alter i. Tagen	Virus	Dosis (Ei-ID ₅₀)
Kontrollen	-	-	-	-	-	53	HP-Weesp	
							i.v. kutan	
1	194.	5	10 ^{7,03}	26	10 ^{7,53}	"	"	i.v. kutan
	"	"	10 ^{6,03}	"	10 ^{6,53}	"	"	i.v. kutan
2	269.	"	10 ^{7,03}	"	10 ^{7,53}	"	"	i.v. kutan
	"	"	10 ^{6,03}	"	10 ^{6,53}	"	"	i.v. kutan
3	346.	"	10 ^{7,03}	"	10 ^{7,53}	"	"	i.v. kutan
	"	"	10 ^{6,03}	"	10 ^{6,53}	"	"	i.v. kutan
4	401.	"	10 ^{7,30}	"	10 ^{7,78}	"	"	i.v. kutan
	"	"	10 ^{6,30}	"	10 ^{6,78}	"	"	i.v. kutan

Tabelle 12: Versuchsanordnung zur zweimaligen Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken mit verschiedenen stark attenuiertem HP-1-Virus

Die Gruppe 1A, mit HP-1-Virus der 194. FHE-Passage vakziniert, war sowohl nach intravenöser als auch nach kutaner Testinfektion in Gesamtheit immun. Die zehnfach schwächere Dosierung schützt in der Gruppe 1B 9 von 13 (zentrale Immunität) bzw. 11 von 13 Tieren (Hautimmunität). Die Erkrankungen der nicht immunen Tiere entsprachen denen der Kontrollen.

Nach Impfung mit dem HP-1-Virus der 269. Passage bewiesen bei den Tieren (Gruppe 2A), die eine höhere Impfdosis erhalten hatten ($10^{7,03}/10^{7,53}$ KID₅₀), 14 von 15 eine zentrale bzw. 12 von 13 Tieren eine Hautimmunität. Eine Einzeldosis von nur $10^{6,03}/10^{6,53}$ KID₅₀ (Gruppe 2B) bewirkte bei 10 von 15 kutan infizierten Tieren eine Schnellreaktion als Zeichen einer Hautimmunität. Die 5 erkrankten Tiere bildeten typische Pocken aus. Wegen eines technischen Fehlers konnten die intravenös getesteten Tiere dieser Gruppe nicht ausgewertet werden.

Unter den Tieren, denen die 346. FHE-Passage des HP-1-Virus über das Trinkwasser mit einer Einzeldosierung von $10^{7,03}/10^{7,53}$ KID₅₀ verabreicht worden war (Gruppe 3A), ließen 13 von 14 eine zentrale Immunität bzw. 9 von 12 Tieren eine lokale Hautimmunität erkennen. Die erkrankten Tiere zeigten nach intravenöser Testinfektion lediglich einzelne Pockenpusteln an der Haut von Kamm und Kehllappen. In der Gruppe 3B (Einzeldosis $10^{6,03}/10^{6,53}$ KID₅₀) zeigten 5 von 8 Tieren einen Hautschutz bei kutaner Belastungsinfektion. Auch in dieser Gruppe war es nicht möglich, die intravenös getesteten Tiere auszuwerten.

Wesentlich schlechtere Ergebnisse erbrachten die Gruppen 4A und 4B, die mit dem stark attenuierten HP-1-Virus der 401. FHE-Passage vakziniert worden waren. Die Einzeldosis von $10^{7,30}/10^{7,78}$ KID₅₀ (Gruppe 4A) schützte nur 8 von 13 Tieren gegen eine intravenöse Testinfektion und nur 7 von 14 Versuchstieren gegen eine kutane Belastung. Die zehnfach niedrigere Impfdosis in der Gruppe 4B ($10^{6,30}/10^{6,78}$ KID₅₀) hatte nur jeweils bei 3 von 16 Tieren zu einem belastbaren Schutz geführt. Das klinische Bild der erkrankten Impflinge glich dem der Kontrolltiere. Einen Überblick über die Ergebnisse dieser Versuche vermittelt die Tabelle 13.

Versuchs- gruppe	Testinfektion						Immunitätsrate (immun/insgesamt)	
	Zahl d. Tiere	Modus	negativ	generalisierend	Pustel- reaktion	Schnell- reaktion	Zentral	Haut
Kontrollen	16	i.v.	0	16	0	-	0 / 16 (0%)	-
	18	kutan	0	(3)	18	0	-	0 / 18 (0%)
1	12	i.v.	12	0	-	-	12/12 (100%)	-
	12	kutan	12	0	0	12	-	12/12 (100%)
B	13	i.v.	9	4	-	-	9 / 13 (70%)	-
	13	kutan	2	0	2	9	-	11/13 (85%)
A	15	i.v.	14	1	-	-	14/15 (93%)	-
	13	kutan	1	0	1	11	-	12/13 (92%)
B	15	i.v.	-	-	-	-	n.a.	-
	15	kutan	0	0	5	10	-	10/15 (67%)
A	14	i.v.	13	1	-	-	13/14 (93%)	-
	12	kutan	1	0	3	8	-	9 / 12 (75%)
B	8	i.v.	-	-	-	-	n.a.	-
	8	kutan	0	0	3	5	-	5 / 8 (62%)
A	13	i.v.	8	5	-	-	8 / 13 (61%)	-
	14	kutan	0	0	7	7	-	7 / 14 (50%)
B	16	i.v.	3	13	-	-	3 / 16 (18%)	-
	16	kutan	1	0	13	2	-	3 / 16 (18%)

n.a.: wegen eines technischen Versehens war in dieser Gruppe eine Auswertung nicht möglich

Tabelle 13: Überblick über die Wirksamkeit einer Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung mit Impfstoffen aus unterschiedlich stark verunreinigtem Wasser

3.2.4 Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Hühnerpocken-Trinkwasservakzinierung mit HP-1-Virus der 194./195.- und 272./273. FHE-Passage

DANNER und MAYR (1972) stellten nach peroraler Verabreichung des stark attenuierten HP-1-Virus (ca. 400. FHE-Passage) eine Abhängigkeit des Impferfolges von der Impfdosis fest. Analog zu diesen Untersuchungen war von Interesse, ob auch bei dem weniger stark attenuierten HP-1-Virus der Impferfolg dosisabhängig ist und welche optimale Impfdosis sich ermitteln ließ.

3.2.4.1 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 194./195. FHE-Passage

Hühnerpockenvirus, Stamm HP-1 der 194. bzw. 195. FHE-Passage, wurde vier verschiedenen Tiergruppen je zweimal im Alter von 5 und 28 Tagen in unterschiedlich hohen Impfdosen über das Trinkwasser verabreicht. Die Einzeldosen pro Tier und Impfung betrugen in den einzelnen Gruppen $10^{7,5}$, $10^{6,5}$, $10^{5,5}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀. Alle Versuchsgruppen (1 bis 4) sowie nicht geimpfte Kontrollen wurden im Alter von 63 Tagen (5 Wochen nach Revakzination der Versuchstiere) mit dem virulenten Hühnerpocken-Virus, Stamm Weesp II (Titer: $10^{5,5}$ Ei-ID₅₀/ml) infiziert. Jeweils die Hälfte jeder Tiergruppe bekam 1 ml intravenös bzw. 0,05 ml über wenigstens 25 bis 30 Federfollikel des Unterschenkels verabreicht. Über die Versuchsanordnung gibt die Tabelle 14 Auskunft.

Auch in diesem Versuch erwies sich der Impfstamm HP-1 der 194. bzw. 195. FHE-Passage als vollkommen unschädlich. Ein interkurrierendes Auftreten von Kokzidiose und Marekscher Erkrankung (Tumorform) bei einem Teil der Versuchstiere führte zu vereinzelt Todesfällen. Mit der Vakzinierung können diese Erkrankungen nicht in Zusammenhang gebracht werden,

Gruppe	Impfung		Testinfektion			
	Alter d. Tiere in Tagen	Virus (FHE-Passage)	Einzelosis (KID ₅₀)	Alter d. Tiere in Tagen	Virus	Dosis (E ₁ -ID ₅₀)
Kontrollen	-	-	-	63	Weesp II	i.v. kutan
1	5 und 28	194./195.	10 ^{7,5}	"	"	i.v. kutan
2	"	"	10 ^{6,5}	"	"	i.v. kutan
3	"	"	10 ^{5,5}	"	"	i.v. kutan
4	"	"	10 ^{4,5}	"	"	i.v. kutan

Tabelle 14: Versuchsanordnung zur zweimaligen Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken mit unterschiedlich hohen Impfdosen (HP-1-Virus, 194. bzw. 195. FHE-Passage)

da auch ein Teil der räumlich getrennt gehaltenen, nicht geimpften Kontrolltiere betroffen war. Alle Tiere wurden mit Whitsyn (Fa. Withmoyer, Brüssel) laut Vorschrift des Herstellers behandelt und entwickelten sich im weiteren Versuchsverlauf normal.¹

Bezüglich der Wirksamkeit der verschiedenen Vakzinen zeigte die intravenös und kutane Belastungsinfektion erhebliche Unterschiede auf. Die Belastungsinfektion erwies sich als besonders stark. Die nicht geimpften Kontrolltiere erkrankten nach intravenöser Infizierung in allen Fällen generalisiert mit zahlreichen, teils konfluierenden Pusteln an Haut und Schleimhaut des Kopfes und mit vereinzelt Pockenpusteln an den Extremitäten. Es konnten etwa 100 bis zu 240 Pusteln an Kamm und an den Kehllappen gezählt werden. Die Reaktion der Kontrolltiere auf die kutane Infizierung bestand in starker Pustelbildung mit erheblichen Schwellungen im Gebiet der Applikationsstelle. Teilweise erkrankten auch diese Tiere an einer generalisierten Pockenform.

Die Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung bei den geimpften Tieren lassen sich wie folgt zusammenfassen (siehe Tabelle 15): In der Gruppe 1 (Einzeldosis pro Impfung $10^{7,5} \text{ KID}_{50}$) erkrankte keines der je 12 intravenös bzw. kutan testinfizierten Tiere. Bei der Gruppe 2 (Einzeldosis pro Impfung $10^{6,5} \text{ KID}_{50}$) war die Immunitätslage etwas schlechter. 7 von 10 intravenös infizierten Tieren waren immun. Die 3 erkrankten wiesen zwar an Haut und Schleimhaut des Kopfes zahlreiche Pockenpusteln auf, deren Menge aber deutlich unter derjenigen bei den Kontrolltieren lag. An den Extremitäten konnte keine Pustelbildung beobachtet werden. Von den 11 kutan infizierten Tieren zeigte eines keine Reaktion, 8 entwickelten eine Schnellreaktion und 2 bildeten typische Pusteln aus.

Wesentlich schlechter waren die Ergebnisse bei der Gruppe 3 (Einzeldosis $10^{5,5} \text{ KID}_{50}$). Hier erkrankten 10 von 15 Hähnen. Das Bild der Erkrankung ähnelte dem der Kontrolltiere. Es traten zahlreiche (ca. 70 bis 120), teils konfluierende Pusteln an Kamm und Kehllappen auf. Auch an den Schleimhäuten des Kopfes traten mehr oder weniger stark ausgeprägte Pockenpusteln auf. Die Extremitäten waren bei 3 Erkrankten befallen. Zehn der 15 kutan testinfizierten Tiere antworteten mit einer ausgeprägten Pustelreaktion

¹Dem Kleintiergesundheitsamt Bayern e.V. (Leiter Prof. Dr. Dorn) sei für die freundliche Beratung herzlich gedankt.

Gruppe	Impfung	Testinfektion						Immunitätsrate immun / insgesamt	
		Zahl d. Tiere	Modus	negativ	Generalisierung	Schnellreaktion	Pustelreaktion	zentral	Haut
Kontrollen	- Einzel- dosis (KID ₅₀)	10	i.v.	-	10	-	-	0 / 10 (0%)	-
		12	kutan	-	(2)	0	12	-	0 / 12 (0%)
1	10 ^{7,5}	12	i.v.	12	0	-	-	12/12 (100%)	-
		12	kutan	0	0	12	0	-	12/12 (100%)
2	10 ^{6,5}	10	i.v.	7	3	-	-	7/10 (70%)	-
		11	kutan	1	0	8	2	-	9/11 (82%)
3	10 ^{5,5}	15	i.v.	5	10	-	-	5/15 (33%)	-
		15	kutan	0	0	5	10	-	5/15 (33%)
4	10 ^{4,5}	14	i.v.	2	12	-	-	2/14 (14%)	-
		15	kutan	0	0	3	12	-	3/15 (20%)

Tabelle 15: Überblick über die Wirksamkeit einer Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung mit unterschiedlichen Dosen des HP-1-Impfvirus der 194. bzw. 195. FHE-Passage

die in 6 Fällen allerdings rascher einsetzte als bei den nicht geimpften Kontrolltieren. Die anderen Küken entwickelten eine Schnellreaktion als Zeichen einer Immunität. In der Gruppe 4 (Einzeldosis pro Impfung $10^{4,5}$ KID₅₀) erkrankten 12 von 14 intravenös und 12 von 15 kutan infizierten Tieren. Der Grad der Generalisierung und das äußere Bild der Pockenpusteln an Haut, Schleimhaut und Extremitäten unterschieden sich bei den erkrankten Impflingen nicht von denen der Kontrolltiere.

3.2.4.2 Untersuchungen mit dem HP-1-Virus der 272./273. FHE-Passage im Rahmen eines praxisbezogenen Impfprogrammes

Im Versuch 3.2.3.1 (Virulenzprüfung in Eintagsküken) hatte das HP-1-Virus der 196. FHE-Passage für das Eintagsküken noch eine beachtliche Restvirulenz gezeigt. Im vorliegenden Feldversuch wurde deshalb attenuiertes HP-1-Virus derjenigen FHE-Passage zur Vakzination herangezogen, die nach intravenöser Infektion nicht mehr zu Todesfällen führte. Diesem Virus (272./273. FHE-Passage) war eine praktische Bedeutung für die Trinkwasservakzination in der Geflügelhaltung beizumessen.

Um die Optimaldosis bei einer oralen Hühnerpocken-Impfung zu bestimmen, die auch unter Praxisbedingungen für einen belastbaren Schutz ausreicht, wurde der Hühnerpocken-Impfstoff im Rahmen eines praxisüblichen Impfprogrammes in unterschiedlicher Dosierung eingesetzt.

Im einzelnen wurden die Versuchsgruppen 1 bis 4 am 1. Lebenstag intramuskulär gegen Marek'sche Erkrankung geimpft und über das Trinkwasser am 10. Tag kombiniert gegen Hühnerpocken (HP-1-Virus, 272. FHE-Passage) und Newcastle Disease (ND-B1-Vakzine), am 22. Tag gegen Infektiöse Bronchitis (Resprovac I) und am 35. Tag zum zweiten Mal gegen Hühnerpocken und Newcastle Disease (ND-LS-Vakzine) vakziniert. Die Tabelle 16 enthält den Impfplan. Den Kontrolltieren wurden bei den Impfungen am 10. und 35. Tag nur die ND-Komponente verabreicht. Ansonsten wurden sie wie die Versuchsgruppen 1 bis 4 geimpft.

Impfungen			
Alter d. Tiere in Tagen	Impfstoff	Modus	Einzelosis
1	Marek-Disease-Lebendvakzine Op.Nr. 13 ¹	i.m.	1 Dosis ²
10	ND-B1-Vakzine Op.Nr. 1085 ¹ und HP-1-Virus, 272. FHE-Passage ³	Trink- wasser	1 Dosis ² unterschiedlich (siehe Tab.17)
22	IB-Resprovac I Op.Nr. 652 ¹	Trink- wasser	1 Dosis ²
35	ND-LS-Vakzine Op.Nr. 15 ¹ und HP-1-Virus, 273. FHE-Passage ³	Trink- wasser	1 Dosis ² unterschiedlich (siehe Tab. 17)

¹: Impfstoffe der Behringwerke AG., Marburg/Lahn.

²: Dosierungen laut Herstellervorschrift

³: Den Kontrolltieren wurde nur die ND-Komponente verabreicht

Tabelle 16: Übersicht über das Impfprogramm im Versuch 3.2.4.2

Zur Impfung gegen Hühnerpocken wurde das in der 272. bzw. 273. Passage in Hühnerembryo-Fibroblasten-Kulturen attenuierte Hühnerpocken-Virus, Stamm HP-1, eingesetzt. Vier verschiedene Tiergruppen wurden im Alter von 10 und 35 Tagen zweimal mit unterschiedlichen Virusdosen geimpft. Die Dosen pro Tier und Impfung betrugen in den einzelnen Gruppen $10^{7,0}$ und $10^{7,5}$, $10^{6,0}$ und $10^{6,5}$, $10^{5,0}$ und $10^{5,5}$ sowie $10^{4,0}$ und $10^{4,5}$ KID₅₀ (Erstimpfung/Revakzinierung). Keines der 120 mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen geimpften Tiere zeigte postvakzinale Schäden.

Vier Wochen nach der Zweitimpfung wurde der Impferfolg durch intravenöse bzw. kutane Belastungsinfektion mit dem homologen HP-1-Virus, 24. FHE-Passage, getestet. Der Versuchsplan ist in Tabelle 17 dargestellt.

Die Belastungsinfektion erwies sich als sehr stark. Nach intravenöser Infektion erkrankten alle Kontrolltiere generalisiert mit zahlreichen, aber nicht konfluierenden Effloreszenzen an Haut und Schleimhaut des Kopfes. Die Tiere zeigten an den Extremitäten deutliche Pocken. Auf die kutane Testinfektion reagierten die Kontrolltiere mit einer schweren lokalen Pockenbildung.

Die Tiere der Gruppe 1, die pro Impfung eine Dosis von $10^{7,0}/10^{7,5}$ KID₅₀ (Erstimpfung/Zweitimpfung) erhalten hatten, waren gegenüber der Belastungsinfektion fast vollständig immun. Nur 1 von 11 Tieren erkrankte nach intravenöser Testinfektion.

Die zehnfach geringere Impfdosis in der Gruppe 2 hatte bei 6 von 11 der intravenös bzw. bei 4 von 11 der kutan testinfizierten Tiere zu einem vollständigen Schutz geführt.

Wesentlich schlechtere Resultate ergaben sich in der Gruppe 3 (Dosis pro Tier und Impfung $10^{5,5}/10^{5,0}$ KID₅₀). Hier erkrankten 8 von 11 Hühnern nach intravenöser Belastungsinfektion an einer ausgeprägten generalisierenden Pockenform. Bei den kutan infizierten Hühnern blieb 1 von 11 ohne Reaktion, ein weiteres antwortete mit einer typischen Schnellreaktion. Die übrigen Tiere reagierten mit starker Pustelbildung an der Infektionsstelle.

Gruppe	Impfung				Testinfektion		
	Alter der Tiere (Tg.)	Virus (FHE-Passage)	Einzel-dosis Erstimpfg.	(KID ₅₀) Zweitimpfg.	Alter der Tiere (Tg.)	Virus	Modus
Kontrollen	-	-	-	-	65	HP-1, 24.FHE-P.	kutan i.v.
1	10 u. 35	272. u. 273. 1./2. Impfg.	10 ^{7,0}	10 ^{7,5}	"	"	kutan i.v.
2	"	"	10 ^{6,0}	10 ^{6,5}	"	"	kutan i.v.
3	"	"	10 ^{5,0}	10 ^{5,5}	"	"	kutan i.v.
4	"	"	10 ^{4,0}	10 ^{4,5}	"	"	kutan i.v.

Tabelle 17: Versuchsanordnung zur zweimaligen Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken mit unterschiedlich hohen Impfdosen (HP-1-Virus, 272. bzw. 273. FHE-Passage) im Rahmen eines kombinierten Impfprogrammes.

i.v.:
10^{6,5}

kutan:
10^{5,3}

Gruppe	Impfung		Testinfektion					Immunitätsrate (immun/insgesamt)	
	Einzelimpfung	(KID ₅₀)	Zahl d. Tiere	Modus	negativ	Generalisierung	Schnellreakt.	Pustelreakt.	
Kontrollen	-	-	14	i.v.	0	14	-	-	-
			14	kutan	0	(2)	0	14	0 / 14 (0%)
1	10 ^{7,0}	10 ^{7,5}	11	i.v.	10	1	-	-	-
			11	kutan	11	0	11	0	10/11 (91%)
2	10 ^{6,0}	10 ^{6,5}	11	i.v.	6	5	-	-	-
			11	kutan	0	0	4	7	6/11 (54%)
3	10 ^{5,0}	10 ^{5,5}	11	i.v.	3	8	-	-	-
			11	kutan	1	0	1	9	3/11 (27%)
4	10 ^{4,0}	10 ^{4,5}	11	i.v.	1	10	-	-	-
			11	kutan	1	0	0	10	1/11 (9%)

Tabelle 18:

Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung bei HP-Trinkwasservakzinierung mit abgestuften Impfdosen (HP-I-Virus, 272. bzw. 273. FHE-Passage) im Rahmen eines kombinierten Impfprogrammes.

In der Gruppe 4 (Dosis pro Tier und Impfung $10^{4,0}/10^{4,5}$ KID₅₀) erkrankten je 10 von 11 Tieren nach intravenöser bzw. kutaner Belastung in gleicher Stärke wie die Kontrolltiere. Einen Überblick über die Versuchsergebnisse gibt die Tabelle 18.

3.2.5 Anwendung der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung in der Praxis¹

Die Eignung der Trinkwasservakzinierung gegen Hühnerpocken war auch für Praxisverhältnisse nachzuweisen. In einem Legehennen-Aufzuchtbetrieb wurden deshalb 1.100 Küken mit dem HP-1-Virus der 400. FHE-Passage geimpft. Kernfragen bei diesen Untersuchungen waren das Verhalten des Impfstoffes im Tränkesystem sowie die Unschädlichkeit der Impfung bei einer großen Anzahl auf engstem Raum (Käfige) gehaltener und bis zu dreimal revakzinierter Tiere.

Gemäß der Zielsetzung wurde zunächst untersucht, wie sich das Impfvirus im Tränkesystem verhält (Plastikrohrleitung mit Nippeltränken). Dieses wurde zunächst restlos entleert. Dann wurde es aus einem zentralen Vorratsbehälter mit der frisch angesetzten Impfstoff-Trinkwasser-Verdünnung gefüllt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben aus dem Vorratsbehälter und in verschiedener Entfernung davon aus den Nippeln abgenommen und auf ihren Virusgehalt titriert. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 19. Während der für die Impfung anzusetzenden Zeit von etwa 6 Stunden blieb die Viruskonzentration sowohl im Vorratsbehälter als auch an den Auslaßstellen erhalten. Die Trinkwasserimpfung wurde ohne vorherigen Wasserentzug gestartet. Die eingesetzten Impfdosen lagen bei ca. $10^{7,0}$ KID₅₀ des HP-1-Virus pro Tier und Impfung.

¹: Diese Versuche wurden durch das Entgegenkommen der Fa. Kathmann, Calveslage, ermöglicht.

Herrn Dr. V. André sei für seine freundliche Unterstützung vielmals gedankt.

Titer der Probeentnahme (KID_{50}/ml)				
Zeitpunkt der Probeentnahme	Vorratsbehälter	1 Meter hinter d. Vorratsbehälter	5 Meter hinter d. Vorratsbehälter	10 Meter hinter d. Vorratsbehälter
Bei Beginn der Impfung	$10^{6,25}$	$10^{5,5}$	-	-
2. Std. nach Beginn	$10^{5,75}$	$10^{5,75}$	$10^{6,0}$	$10^{5,75}$
4. Std. nach Beginn	$10^{5,5}$	$10^{6,0}$	$10^{5,75}$	$10^{5,75}$
6. Std. nach Beginn	$10^{5,75}$	$10^{5,75}$	$10^{6,25}$	$10^{6,0}$

Tabelle 19: Überblick über Verteilung und Konzentration des Impfvirus im Tränkesystem.

In verschiedenen Tiergruppen wurde die Vakzinierung in unterschiedlichem Alter begonnen und verschieden oft wiederholt (1 bis 3 Wiederimpfungen). Gruppe 1 (325 Tiere in 5 Käfigen) bekam den Impfstoff im Alter von 22 Tagen verabreicht und wurden am 42. Tag revakziniert, ebenso Gruppe 2 (260 Tiere in 4 Käfigen), die jedoch am 84. Tag ein drittes Mal geimpft wurde. Bei den Gruppen 3 (260 Tiere in 4 Käfigen) und 4 (260 Tiere in 4 Käfigen) begannen die Impfungen bereits am 7. Lebenstag. Für die Gruppe 3 schlossen sich zwei Wiederholungsimpfungen am 22. und 42. Tag an, Gruppe 4 erhielt am 84. Tag eine zusätzliche vierte Impfung. Die Impftermine richteten sich nach dem betriebseigenen Impfkalendar. Am 22., 42. und 84. Tag wurde die Hühnerpockenvakzinierung gleichzeitig mit der routinemäßigen Trinkwasserimpfung gegen Newcastle Disease durchgeführt. Die Einzelheiten der Versuchsanordnungen sind in den Tabellen 20 und 21 enthalten.

Im Verlauf des Impfprogrammes erwies sich in dem Großbetrieb die vollkommene Unschädlichkeit des HP-1-Virus der 400. bis 403. FHE-Kulturpassage. Keines der zum Teil viermal mit hohen Virusdosen geimpften Tiere zeigte Anzeichen einer Impferkrankung und sonstiger von der Norm abweichender Entwicklungs- und Gesundheitsstörungen.

Aus technischen Gründen standen keine geimpften Tiere zur Verfügung, um die Wirksamkeit der Trinkwasserimpfungen mittels Testinfektion zu kontrollieren. Aus der Menge des aufgenommenen Impfstoffes und dessen Viruskonzentration kann man schließen, daß jedes Tier pro Impfung im Durchschnitt mindestens $10^{7,0}$ KID₅₀ des HP-1-Impfvirus aufnehmen konnte. Diese Dosierung hat in allen früheren Versuchen bei zweimaliger Verabreichung zu einem ausreichenden Populationsschutz geführt (MAYR et al., 1971a, 1971 b; DANNER und MAYR, 1972).

Nachdem die technischen Bedingungen des hier beschriebenen Versuchs einwandfrei waren, kann bei der gewählten Impfstoffdosierung sowie bei der Zahl der Revakzinationen mit einem sicheren Bestandsschutz gerechnet werden.

Impfgruppe	Käfig	Anzahl der Tiere	Anzahl der Impfungen	Impfungen durchgeführt i. Alter von				
				7 Tagen	22 Tagen ¹	42 Tagen ¹	84 Tagen ¹	
1	1 - 5	325	2	-	+	+	-	
2	6 - 9	260	3	-	+	+	+	
3	10 - 13	260	3	+	+	+	-	
4	14 - 17	260	4	+	+	+	+	
Kontrollen	18 ff.	29000	0	-	-	-	-	

¹ : Zusammen mit Trinkwasserimpfung gegen Newcastle Disease

Tabelle 20: Impfplan für die mehrfache Trinkwasserimpfung gegen
Hühnerpocken in einem Legehennen-Aufzuchtbetrieb

Alter d. Tiere i. Tg.	Impfvirus		Anteil von Impf- virus i. Trinkwasser	Durchschnittl. auf- genommene Trinkwas- sermenge pro Tier und Impfung	Einzelosis (KID ₅₀) ¹	Geimpfte Gruppen
	Passage	Titer (KID ₅₀)				
7	400.	10 ^{7,50} /ml	1 : 10	20 ml	10 ^{7,30}	3,4
22	401.	10 ^{7,25} /ml	1 : 10	20 ml	10 ^{7,05}	1,2,3,4
42	402.	10 ^{7,25} /ml	1 : 10	20 ml	10 ^{7,05}	1,2,3,4
84	403.	10 ^{7,50} /ml	1 : 10	20 ml	10 ^{7,30}	2,4

¹: Die Verschickung und Verabreichung des Impfvirus führten zu einem Infektiositätsverlust von ca. 10^{0,50} KID₅₀/ml.

Tabelle 21: Daten der einzelnen Impfungen gegen Hühnerpocken
in einem Legehennen-Aufzuchtbetrieb

3.3 Besprechung der Ergebnisse

Die orale Impfung findet wegen ihrer Vorzüge (MAYR et al., 1971a) immer mehr Verwendung in der Medizin. RAETTIG (1971) bezeichnet sie sogar als "Impfprophylaxe der Zukunft". Eine perorale Impfung führt nicht nur zu einer guten humoralen Immunität, sondern auch zu einem lokalen Schutz an den Schleimhäuten des Digestions- (KONO et al., 1970) und oberen Respirationstraktes (MOREIN, 1970; HEUSCHELE und EASTERDAY, 1970; YOSHIDA et al., 1970). Darüber hinaus ist eine per os-Immunsierung schon während der Neugeborenenphase möglich (RAETTIG und GANZE, 1971). Auch bereiten Revakzinationen wegen der verminderten Allergiegefahr keine Schwierigkeiten.

In der Tiermedizin sind es vor allem wirtschaftliche Gesichtspunkte, die eine orale Immunisierung wünschenswert erscheinen lassen. Die hohen Tierzahlen besonders der Geflügel-Massenhaltung erfordern rasch durchführbare und wirtschaftlich tragbare Impfungen. Bei der Schutzimpfung gegen Newcastle Disease, Infektiöse Bronchitis und Aviäre Encephalomyelitis hat sich die Verabreichung des Impfstoffes über das Trinkwasser seit Jahren bewährt. Dagegen muß die Pockenimpfung noch individuell durchgeführt werden (perkutan mit der Flügelstichmethode). Die erhöhten Impfkosten führten hier zu einer Vernachlässigung der Impfungen und zum verstärkten Hochkommen von Pockenerkrankungen.

Der Beweis, daß gegen Pocken auch auf oralem Wege wirksam geschützt werden kann, konnte in Versuchen von MAYR et al. (1971a, 1971b) sowie RATH (1971) am Modell der Hühnerpocken-Infektion erbracht werden, wenn ganz bestimmte Bedingungen erfüllt waren. So hatte das Alter der Küken bei der Erstimpfung keinen Einfluß auf die Wirksamkeit der Trinkwasservakzinierung. Küken ließen sich gleichermaßen gut immunisieren, wenn sie erstmals mit 5 Tagen oder mit 3 Wochen geimpft wurden. Dagegen erwies sich der Applikationsmodus bei der Hühnerpocken-Impfung als wesentlicher Faktor. Über das Trinkwasser gegeben war der Impfstoff wesentlich wirksamer als bei Verabreichung mittels Pipette. Die Trinkwasserimpfung ist der kutanen Vakzinierung vom Erfolg her adäquat

(RATH, 1971; MAYR et al., 1971a). Darüber hinaus hängt der Impferfolg entscheidend von der I m p f d o s i s ab (DANNER und MAYR, 1972). Obwohl das zu all diesen Impfungen verwendete HP-1-Virus hochattenuiert und für Eintagsküken vollkommen unschädlich ist (MAYR und MALICKI, 1966), hat es seine Immunogenität behalten. Die Wirksamkeit der Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken basiert also nicht auf einer R e s t v i r u l e n z des Impfvirus.

In der vorliegenden Studie konnten w e i t e r e B e d i n g u n g e n erarbeitet werden, die für den Erfolg einer Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken notwendig sind. Sie betreffen den I m p f l i n g in gleichem Maße wie den I m p f s t o f f.

Für den Erfolg einer Impfung ist zunächst die W i r k s a m k e i t s - p r ü f u n g der Vakzine Voraussetzung. Bei den Pockenerkrankungen läuft das Immungeschehen hauptsächlich zellgebunden ab. Insofern können Serum-Antikörper kaum etwas über den Immunstatus aussagen. Bei der Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpockenimpfstoffen benutzt man deshalb stets die Belastungsinfektion. Der Ausgang dieser Testinfektion kann durch drei Faktoren variiert werden: 1. durch den zum Challenge benutzten V i r u s s t a m m, 2. durch die C h a l l e n g e - D o s i s und 3. durch den C h a l l e n g e - M o d u s.

Aus verschiedenen Untersuchungen bei Impfungen gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bronchitis weiß man, daß das Ergebnis einer Impfstoff-Wirksamkeitsprüfung nicht wesentlich durch den T e s t s t a m m beeinflusst wird (EISSNER und SIEGERT, 1955; GEHRING und GEISS, 1958; BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1964b; BENGELSDORFF, 1965; von BOLOW, 1966a; VIELITZ und LANDGRAF, 1971). Dies beweist, daß das Impfvirus nicht nur einen stammspezifischen Schutz vermittelt, sondern eine Immunität auch gegen heterologe Feldstämme aufbaut, soweit sie dem gleichen Serotyp angehören.

In den Versuchen von MAYR und Mitarbeitern (1971, 1972) war zum Nachweis des Infektionsschutzes eine Belastungsinfektion mit dem h o m o l o g e n virulenten HP-1-Virus benutzt worden. Dieser Virusstamm führt bei einer intravenösen Gabe von etwa 10^5 bis 10^6 Ei-ID₅₀ bzw. kutaner Verabreichung

von 10^4 bis $10^{4,5}$ Ei-ID₅₀ zu einer schweren generalisierten bzw. lokalen Erkrankung sensibler Tiere. In den eigenen Versuchen wurde zur Immunitätsprüfung der mit dem attenuierten HP-1-Virus geimpften Hühner auch der heterologe Hühnerpocken-Virusstamm Weesp II eingesetzt, um zu prüfen, ob das HP-1-Impfvirus gegenüber homologen Stämmen eventuell besser immunisiert als gegenüber heterologen. Zur Angleichung der Versuchsbedingungen ist dabei das Weesp II-Virus zur Testinfektion in einer Dosis eingesetzt worden, die sensible Hühner in gleicher Stärke krank macht wie der Challenge mit dem bisher verwendeten HP-1-Testvirus. Die adäquate Virusmenge lag bei ca. $10^{4,5}$ Ei-ID₅₀ für den intravenösen und ca. $10^{3,2}$ Ei-ID₅₀ für den kutanen Challenge, also etwa 10-fach niedriger als beim HP-1-Testvirus.

Zweimal über das Trinkwasser mit dem HP-1-Impfvirus der 400. FHE-Passage geimpfte Tiere entwickelten gegenüber beiden Testviren einen einheitlichen Immunschutz, wenn sie mit gleichen "klinischen Dosen" des homologen bzw. heterologen Testvirus belastet wurden. Die Versuche beweisen, daß eine Trinkwasserimpfung mit dem attenuierten HP-1-Impfvirus auch wirksam gegen einen heterologen, stark virulenten Feldstamm schützt. Wurde das Weesp II-Testvirus jedoch 10-fach stärker gegeben (also in gleich vielen Ei-ID₅₀ wie bei Testinfektion mit dem HP-1-Testvirus) erkrankten alle Impflinge. Allerdings reagierten auch die nicht geimpften Kontrollen viel stärker als üblich. Es kam zu ungewöhnlich heftigen Erkrankungen mit einer hohen Todesrate.

Die genannten Versuche demonstrierten, daß eine unterschiedliche Dosierung des Testvirus das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung drastisch verändern kann. Die Ergebnisse von Wirksamkeitsprüfungen werden demnach bei der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung weniger von der Art des Testvirus (Virusstamm) beeinflusst, wohl aber von dessen Dosierung. Dies bestätigen auch Erfahrungen bei der Erfolgskontrolle nach Schutzimpfungen gegen Aviäre Encephalomyelitis (SCHAAF, 1958; von BÖLOW, 1965) und Infektiöse Laryngotracheitis (RAGGI und LEE, 1965a).

Bei Wirksamkeitsprüfungen darf daher für den Challenge nicht generell eine bestimmte Menge an Kultur- oder Ei-infektiösen Dosen verwendet werden. Vielmehr muß für jeden zum Challenge benutzten Virusstamm getrennt die

optimale Menge an infektiösen Einheiten ermittelt werden. Für die Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpockenimpfstoffen mittels intravenöser bzw. kutaner Belastungsinfektion sollten dabei soviel Ei-ID₅₀ bzw. KID₅₀ an Virus eingesetzt werden, daß es bei allen Kontrollen nach intravenöser Applikation zur generalisierten Erkrankung mit multipler, aber nicht konfluierender Pockenbildung kommt und sich nach kutanem Challenge (Feder-follikelmethode) mindestens 15 bis 20 gut ausgebildete Primärpocken entwickeln.

Daß der M o d u s der Belastungsinfektion das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung variiert, konnten BEARD und EASTERDAY (1967a) und RICHEY und SCHMITTLE (1964) bei Erfolgskontrollen nach enteraler Newcastle Disease-Vakzinierung beobachten. Ein Impfschutz wurde bei parenteraler Belastungsinfektion vorgetäuscht, durch lokale Infizierung (z.B. mittels Aerosol) aber durchbrochen. Unabhängig vom gewählten Impfmodus erweist sich eine Belastungsinfektion häufig dann am stärksten, wenn sie dem natürlichen Infizierungsgeschehen entspricht. Bei der Newcastle Disease und Infektiösen Bronchitis erfolgt die Infizierung in der Regel über die Schleimhäute des Respirationsapparates. Die Challengegeteste bei diesen Geflügelkrankheiten sind hiernach ausgerichtet.

Die Wirksamkeitsprüfung von Pockenimpfstoffen erfolgt in der Human- und Tiermedizin seit jeher kutan. Da die natürliche Infizierung in der Regel jedoch als Tröpfcheninfektion über die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes und Digestionstraktes zustande kommt, wurde geprüft, welchen Einfluß ein Challenge über das Trinkwasser auf das Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung hat. Wenn dabei entsprechend abgestuft gearbeitet wird, treten im Ergebnis der Wirksamkeitsprüfung nach kutanem, intravenösem oder oralem Challenge keine Unterschiede auf.

Einen wichtigen Faktor für die Wirksamkeit einer aktiven Schutzimpfung stellt der p a s s i v e I m m u n s t a t u s der Impflinge dar. Es ist bekannt, daß maternale Antikörper (transovariell, diaplazentar oder kolostral erworben) im Organismus der Neugeborenen mit einer aktiven Immunisierung interferieren und so die Ausbildung eines aktiven Schutzes

verhindern können (UHR und MÜLLER, 1968; EMMERLING et al., 1970). Gerade unter den Bedingungen einer intensiven Tierhaltung kann aber ein Infektionsschutz vom ersten Tage an wirtschaftlich entscheidend sein. So wird z.B. gegen die Mareksche Krankheit bereits am 1. Lebenstag der Küken geimpft. Andererseits erlaubt die heutige epizootologische Situation bei der Newcastle Disease oder der Infektiösen Bronchitis eine Impfung frühestens in einem Alter von 10 Tagen bis 3 Wochen, da die Küken in den ersten Lebenstagen hohe Titer maternalen Antikörper aufweisen, die eine aktive Immunisierung hemmen. Generell läßt sich sagen, daß eine Impfung im Zeitraum passiver Immunität nicht zu optimalen Ergebnissen führt (GAGLIARDI, 1953; DOLL et al., 1958; RAGGI und LEE, 1958; CALNEK et al., 1961; van der HEIDE et al., 1967; STONE und BONEY, 1968; HIGGINS, 1971; SIEGMANN et al., 1974). Es scheint, daß durch e n t e r a l e Applikation eines Impfstoffes die Hemmfunktion von Antikörpern eher umgangen wird als durch eine parenterale Verabreichung (BEARD und EASTERDAY, 1967b; STONE und BONEY, 1968). Gerade in letzter Zeit wird der Vorteil der oralen vor der parenteralen Impfung während der Neugeborenenphase diskutiert (RAETTIG und GANZE, 1971),

MAYR und Mitarbeiter (1971a, 1971b) vakzinieren 5 Tage alte Küken, die aus ungeimpften Beständen stammten, erfolgreich über das Trinkwasser gegen Hühnerpocken. Eine Revakzination im Abstand von wenigen Wochen erhöhte die Quote der aktiv geschützten Tiere. Möglicherweise liegen die Verhältnisse in solchen Betrieben anders, die regelmäßig gegen Hühnerpocken impfen. Es ist wenig über qualitative und quantitative Verhältnisse bei der Übertragung von mütterlichen Antikörpern gegen Hühnerpocken bekannt. Nach Untersuchungen von BOSGRA und ROERINK (1962) findet ein Immuntransfer statt. Es werden neutralisierende Antikörper bis 3 Wochen nach dem Schlupf nachgewiesen. Inwiefern sie eine aktive Immunisierung beeinflussen, wurde nicht untersucht. In einem orientierten Versuch wurde daher geprüft, ob man bei Küken aus geimpften Beständen eine Interferenz zwischen einer maternal erworbenen Immunität und der Wirksamkeit einer Trinkwasserimpfung zu befürchten hat und sie eventuell durch Veränderung des Impfkaltenders umgehen muß. An dieser Stelle sollte auch auf möglicherweise bestehende Unterschiede zwischen Trinkwasser- und Kutanimpfung geachtet werden.

Der Ausgang der Versuche war überraschend.

Insgesamt ließen sich alle Küken in frühestem Alter erfolgreich gegen Hühnerpocken immunisieren. Lediglich bei Tieren aus geimpften Beständen fiel der Impferfolg nach Trinkwasservakzination etwas ab. In klärenden Versuchen an größeren Tierzahlen muß der individuelle Immunstatus der Elterntiere exakt geprüft werden. Eine frühzeitige Impfung gegen Hühnerpocken kann nach den bisherigen Erfahrungen und eigenen Versuchsergebnissen vor allem in Hinblick auf spätere Revakzinierungen empfohlen werden, um schon jüngste Küken vor einer ersten Auseinandersetzung mit einem Feldvirus zu schützen.

Bei der intensiven Geflügelhaltung gelten für Trinkwasserimpfungen zwei wesentliche qualitative Kriterien: 1. Vakzinen können nur dann eingesetzt werden, wenn sie wirtschaftlich sind (MAYR, 1963); 2. Eine Vakzine führt nur dann zum vollen Erfolg, wenn über die Minimaldosis hinaus soviel Impfstoff appliziert wird, daß die zum Teil beträchtlichen Aufnahmeschwankungen innerhalb der Herde ausgeglichen werden können (WINTERFIELD und SEADALE, 1957a; MONREAL, 1971). Beide Faktoren stehen im Widerspruch, da eine Dosiserhöhung den Impfstoff verteuert. Es liegt nahe, die Wirksamkeit und Wirtschaftlichkeit einer Trinkwasservakzine zu erhöhen, indem man noch nicht völlig avirulente Impfkeime einsetzt. Bei vielen Lebendimpfstoffen ist ein gewisser Virulenzgrad geradezu Grundbedingung für ihre Wirksamkeit. Dies gilt vor allem für Vakzinen gegen Infektiöse Bronchitis des Huhnes (RAGGI und BANKOWSKI, 1956; RAGGI und LEE, 1957; HOEKSTRA und RISPENS, 1960a,b; BENGELSDORFF u. SCHNEIDER, 1964a, b; v. BOWLOW, 1966a, 1966b; WOERNLE, 1968), Aviäre Encephalomyelitis (CALNEK und JEHNICH, 1959b; CALNEK et al., 1960, 1961) und Infektiöse Laryngotracheitis (PULSFORD, 1963). Vollkommen avirulente Impferreger gegen diese Geflügelkrankheiten besitzen nur schwache immunogene Wirksamkeit. Eine wichtige Voraussetzung für die allgemeine Anwendung eines Impfstoffes ist dessen Unschädlichkeit. Inaktivierte, virulente Erreger erfüllen diese Forderung weitgehend (RAETTIG, 1967), bei Lebendimpfstoffen ist aber die Wirksamkeit oft mit einer gewissen Restvirulenz und damit einem Risiko gekoppelt.

Um jegliches Impfrisiko auszuschalten, verwendeten MAYR et al., (1971a, 1971b) in ihren Untersuchungen zur Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken

das über 400. Zellkultur-Passagen attenuierte HP-1-Impfvirus. Es ist vollkommen avirulent (MAYR und MALICKI, 1966), und nach dem Kriterium der hohen notwendigen Impfdosis (DANNER und MAYR, 1972) verhält es sich in gewisser Weise wie ein inaktivierter Erreger. Gerade diese große Virusmenge, die zur Erzielung eines guten Schutzes benötigt wird, würde den Impfstoff aber wesentlich verteuern. Es lag nahe zu untersuchen, ob weniger stark attenuiertes HP-1-Impfvirus stärker immunogen wirkt und daher weniger Virus pro Impfdosis notwendig ist. Diese Vermutung bestätigte sich. In eigenen Versuchen wurde das HP-1-Virus auf dem Niveau der 195., 270., 345. und 400. FHE-Passage auf Immunogenität und Unschädlichkeit getestet.

Bezüglich Wirksamkeit unterscheiden sich die einzelnen Viruspassagen insofern voneinander, als ihre Immunogenität mit zunehmender Passagezahl abnimmt. HP-1-Virus der 194. Passage vermittelt bei zweimaliger Gabe von ca. $10^{6,5}$ KID₅₀ einen ausreichenden Populationsschutz, während eine vergleichbar große Menge von HP-1-Virus der 401. Passage nur ca. 20 Prozent der Impflinge zu schützen vermochte. Für einen in der Praxis angestrebten Populationsschutz (80 Prozent Individualschutz) ist von der höheren Passage eine zehnfach höhere Impfdosis erforderlich. Die aus HP-1-Virus der 269. bzw. 346. Passage hergestellten Vakzinen verhielten sich intermediär. Da sich alle getesteten Viruspassagen mit hoher Ausbeute vermehren, liegt der ökonomische Vorzug der niederen Passage auf der Hand.

Als Bemessungsgrundlage der Unschädlichkeit galt bei Vakzinen gegen Hühnerpocken bisher die intramuskuläre (BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1962a, 1962b) oder intravenöse (MAYR, 1959) Verträglichkeit ohne Generalisierung bei Eintagsküken. Die verschiedenen HP-1-Viruspassagen mit Ausnahme der 403. Passage erwiesen sich in diesen Testen mehr oder weniger virulent. Bei der intravenösen Verabreichung an Eintagsküken führte die 196. Passage in hohem Maße zu Todesfällen, bei der intramuskulären Applikation stets zur Erkrankung. Auch in der 271. und 347. Passage war das HP-1-Virus noch virulent für Eintagsküken, allerdings ohne Todesfälle zu verursachen. Nach diesen Kriterien wäre nur das Virus der 400. Passage als Impfstoff unbedenklich. Dem muß die

völlige Unschädlichkeit der unterschiedlich stark attenuierten Impfviren nach Gabe über das Trinkwasser entgegengehalten werden. Alle getesteten Impfstoffe sind für den Impfling auch nach hoher Dosierung und Revakzinierung unschädlich. Selbst Virus der 194. Passage führte bei extrem hoch dosierter peroraler Verabreichung an fünftägige Küken zu keinerlei pathologischen Veränderungen oder Allgemeinstörungen. Obwohl zwischen dem 3. und dem 7. Tag nach der Impfung Virus in Rachengewebe und auch in Rachenspülproben nachgewiesen werden konnte, kam es nicht zur Ausbildung einer zyklischen Infektion und zur Generalisierung. Sicherlich ist über die Mundhöhle eine vorübergehende Virusausscheidung möglich; die geringe Menge an ausgeschiedenem Impfvirus trotz der extrem hohen Applikationsdosis, die in der Praxis niemals erreicht wird, führte zu keiner Haftung bei empfänglichen Kontakttieren. Insofern ist die Ausscheidung des Impfvirus epizootologisch unbedenklich. Es ist in diesem Zusammenhang wesentlich, daß Virus nie im Darm nachgewiesen werden konnte, nicht einmal während der Schluckimpfung. Dies bestätigt zudem die Vermutung, daß die Persorptions-, eventuell auch ein Teil der Immunitätsvorgänge, primär über das Gewebe des oberen Digestionstraktes ablaufen. Beim Virus der 194. Passage bestehen direkte Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg. Auch dieses spricht dafür, daß sich das Impfvirus nicht wie ein virulentes Virus verhält und die Wirkung nicht auf einer - subklinischen - Impferkrankung basiert.

Mit Ausnahme der 403. Passage sind die geprüften Viruschargen nach den bislang aufgestellten Grundlagen für die Virulenzbestimmung (i.v. bzw. i.m. Verabreichungen an Eintagsküken) als Impfstoff nicht geeignet. Aber die Kriterien, die die Unschädlichkeit einer Parenteralvakzine feststellen, gelten nach heutigen Erfahrungen nicht immer auch für Enteralimpfstoffe. Da immer häufiger auf peroralem Wege immunisiert wird, müssen für solche Vakzinen neue Grundsätze der Wertbemessung aufgestellt werden. Diese werden sich natürlich an den jeweiligen epidemiologischen bzw. epizootologischen Gegebenheiten orientieren. So ist z.B. bei der Infektiösen Bronchitis und der Aviären Encephalomyelitis eine Virusausscheidung erwünscht, um das Impfvirus möglichst weit zu

streuen. Anders liegen die Verhältnisse bei den Hühnerpocken. Hier muß kein enzootisch vorhandener, virulenter Erreger durch einen milden Impfstamm verdrängt werden. Eine Ausscheidung von kontagiösem Impfvirus wäre daher epizootisch bedenklich. Für die Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken sollten daher nur solche Impfstoffe zugelassen werden, die nicht zu einer kontagiösen Virusausscheidung führen, d.h. das ausgeschiedene Impfvirus darf nicht per Kontakt auf empfängliche Tiere übergehen, dort haften und zur Wirtsreaktion führen.

Inwiefern quantitative Faktoren auch bei weniger stark attenuiertem HP-1-Virus den Impferfolg variieren können, war Gegenstand weiterer Untersuchungen und sollte damit eine Antwort auf die Frage der praktischen Impfdosierung geben. Bei den enteral verabreichten Virusimpfstoffen gegen Geflügelkrankheiten bestehen Wechselbeziehungen zwischen Virulenz und immunogener Wirksamkeit einerseits und Immunogenität und Impfdosis andererseits (GRUN und HUDSON, 1964; HOEKSTRA, 1966; TOTH und MARKOVITS, 1964; HUYGELEN, 1966). Virulente Impferreger vermehren sich im Impfling so stark, daß die Impfdosis minimal sein kann. Andere Impfkeime sind schwach bzw. avirulent und verhalten sich praktisch wie inaktivierte Mikroorganismen.

Der Impferfolg einer Trinkwasserimpfung gegen Hühnerpocken mit dem HP-1-Impfvirus der 400. Zellkulturpassage hängt direkt von der Impfdosis ab (DANNER und MAYR, 1972). Bei diesem hoch attenuierten Virus liegen die Dosierungsgrenzen zwischen 100%igem Impferfolg (zweimalige Gabe von je 10^8 KID₅₀) und praktischer Wirkungslosigkeit mit einem Faktor von 100 sehr eng. Auch bei dem relativ schwach attenuierten HP-1-Virus der ca. 195. Zellkulturpassage ließen sich solche quantitativen Relationen nachweisen. Eine zweimal verabreichte Impfmenge von ca. $10^{6,5}$ KID₅₀ pro Tier schützt die geimpften Tiergruppen zu nahezu 100%. Die 10- bzw. 100-fache geringere Dosis führt nur noch bei einem Teil der Impflinge zur belastbaren Immunität. Aufgrund seines höheren Virulenzgrades benötigt man von diesem Impfvirus insgesamt weniger als vom hochattenuierten der 400. Passage. Aber auch die Spanne zwischen 100%igem Erfolg und kompletter Wirkungslosigkeit ist beim Virus der 195. Passage größer. Ähnlich liegen auch die Verhältnisse beim Virus der 270. FHE-Passage.

Ohne ein Risiko bezüglich Unschädlichkeit einzugehen, wird man aus wirtschaftlichen Gründen die Verwendung eines weniger attenuierten HP-1-Virus für die

Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung vertreten können. Da sich aber das HP-1-Virus der 270. Passage in seiner Immunogenität nicht wesentlich von dem der 195. Passage unterscheidet, letzteres aber nach intravenöser bzw. intramuskulärer Injektion beim Eintagsküken noch zu Todesfällen führt, scheint das HP-1-Virus auf dem Niveau der 270. Passage für die Praxis am aussichtsreichsten.

Ein Bestreben der Praxis ist es, 1. wirtschaftlich zu dosieren und 2. so wenig Impfungen in einer Tierpopulation durchzuführen wie möglich. Kombinationsimpfungen wie gegen Newcastle Disease und Infektiöse Bronchitis (HANSON, 1956; RICHTER, 1958; LITJENS, 1965; van der HEIDE et al., 1967; BENGELSDORFF, 1971) und Newcastle Disease und Hühnerpocken (BENGELSDORFF und SCHNEIDER, 1963a; SCHNEIDER und BENGELSDORFF, 1963a; MAYR et al., 1971) haben sich bewährt.

Um die optimale Dosierung und die Kombinationsfähigkeit bei der Hühnerpocken-Trinkwasserimpfung festzustellen, wurde in einem der Versuche HP-1-Impfvirus der 271. Passage in unterschiedlichen Dosen im Rahmen eines praxisüblichen Impfprogrammes eingesetzt.

Eine Dosierung von 10^7 KID₅₀ pro Tier bei mindestens zweimaliger Applikation kann aufgrund der Versuchsergebnisse empfohlen werden. Diese Virusmenge ist von der Herstellung her real und garantiert bei einer etwaigen, technisch bedingten, zehnfachen Unterdosierung jedem Tier soviel Impfstoff, daß ein sicherer Herdenschutz gewährleistet ist. Geringere Dosierungen sollten aus diesem Grunde vermieden werden. Seine Eignung für die praktische Hühnerprophylaxe bewies das HP-1-Virus der 270. Passage auch dadurch, daß es durch die anderen durchgeführten Impfungen weder in seiner Unschädlichkeit noch in seiner guten Wirksamkeit beeinflusst wurde. Seinerseits führte es auch nicht zu einem Hochkommen von Impfschäden durch Vakzinationen gegen Mareksche Hühnerlähme, Infektiöse Bronchitis und Newcastle Disease.

Beim Einsatz von Trinkwasservakzinen in der Praxis können klimatische (GHEORGIN und NITTOIN, 1962) und technische (GRAMENZI, 1964; KENTRUP, 1972), besonders aber epidemiologische und immunologische Faktoren den Wert eines im Laboratorium getesteten Impfstoffes stark beeinflussen. Dies gilt vor allem für Impfungen in Intensivhaltungen, wo spezielle ökologische Verhältnisse herrschen (WINTERFIELD und SEADALE, 1957a; MONTI, 1964; HECHT, 1966; BLAXLAND und McLEOD, 1969). Aus vielen Erfahrungen in Geflügelbetrieben weiß man zudem, daß eine sachgemäße Verabreichung von Medikamenten und Impfstoffen über das Tränke-

SIEGMANN und LODERS, 1970). Druckschwankungen, tote Winkel, lange Wege und Fremdstoffen (WINTERFIELD und SEADALE, 1956) sind unter anderem hierfür verantwortlich.

Um die Verwendungsfähigkeit der Trinkwasservakzine gegen Hühnerpocken auch außerhalb der Laborbedingungen zu prüfen, wurden in einem Legehennen-Aufzuchtbetrieb 1.100 Küken geimpft. Kernprobleme bei diesen Untersuchungen waren die Überprüfung technischer Gegebenheiten bei der Impfung über das Tränkesystem und die Frage der Unschädlichkeit des Impfstoffes bei einer großen Menge auf engstem Raum gehaltener Tiere. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich das Impfvirus (400. Passage) wenigstens über 6 Stunden hinweg im Trinkwasser ohne Titerverlust erhält. Dieser Zeitraum reicht in jedem Falle für einen Impfkontakt aus. Bei sorgfältiger Impftechnik verteilt sich der Impfstoff gleichmäßig im Tränkesystem, so daß allen Tieren die gleiche Impfdosis zur Verfügung steht. Zum anderen erwies sich das Hühnerpocken-Impfvirus selbst bei 4-facher Verabreichung in hohen Dosen über das Trinkwasser auch unter den extremen ökologischen Verhältnissen eines Intensivbetriebes als vollkommen unschädlich für die Impflinge. Mit einem belastbaren Schutz bei mindestens 80 Prozent der Impflinge kann gerechnet werden, da wenigstens zwei Virusdosen von je $10^{7,05}$ bis $10^{7,3}$ KID₅₀ aufgenommen wurden. Diese Virusmenge reicht nach Untersuchungen von MAYR et al. (1971a, 1971b) und DANNER und MAYR (1972) aus, um einen sicheren Herdenschutz zu erzielen. Der Erfolg der anderen im Betrieb durchgeführten Impfungen ist nicht gemindert worden.

Somit ist der Einsatz des attenuierten HP-1-Virus zur r o u t i n e m ä s s i g e n Trinkwasserimpfung auch in Intensivhaltungen gerechtfertigt. Als Impfvirus sollte wegen seiner starken Wirksamkeit Virus auf dem Niveau der 200. bis 270. Zellkulturpassage verwendet werden. Da es von den Impflingen nicht in kontagiöser Form ausgeschieden wird, braucht man nicht mit einer Erregerverschleppung und eventuellen Gefährdung nicht geimpfter Herden zu rechnen. Zur Erzielung eines guten und gleichmäßigen Herdenschutzes wird die mindestens zweimalige Verabreichung von $10^{7,0}$ KID₅₀ pro Tier vorgeschlagen. Die kombinierte Durchführung der Pockenimpfung zusammen mit den betriebsüblichen Trinkwasservakzinen gegen Newcastle Disease hat sich bewährt und sollte Routineverfahren werden. Im Hinblick auf einen frühzeitig einsetzenden Pockenschutz kann die Trinkwasserimpfung mit HP-1-Virus allein bereits

in den ersten Lebenstagen erfolgen. Um die optimale Impfdosis für alle Tiere zu garantieren, muß die Trinkwasserimpfung sehr sorgfältig durchgeführt und auf die Gegebenheiten des jeweiligen Tränkesystems technisch abgestimmt werden.

3.4.

Zusammenfassung

Der Erfolg einer oralen Schutzimpfung gegen die Geflügelpocken ist von einer Reihe von Faktoren abhängig. Er wird durch den Impfstoff, die Impftechnik, den Impfling und die Umwelt positiv wie negativ beeinflusst. Die Arbeit bringt einen Beitrag hierzu. Neben bereits Bekanntem konnten folgende Beziehungen erarbeitet werden:

1. Küken lassen sich in jüngstem Alter erfolgreich gegen Hühnerpocken immunisieren. Dies gilt auch für Tiere aus Geflügelbeständen, in denen regelmäßig gegen Hühnerpocken geimpft wird.
2. Die Trinkwasserimpfung mit dem HP-1-Impfvirus vermittelt einen belastbaren Schutz auch gegen heterologe Feldstämme.
3. Die Virulenz des HP-1-Impfvirus für Eintagsküken nimmt mit zunehmender Attenuierung in Zellkulturen rascher ab als seine Immunogenität. Virus der 194. FHE-Passage führt bei Eintagsküken zur generalisierenden Erkrankung und Todesfällen, ist aber als Trinkwasserimpfstoff ca. 10-fach stärker wirksam als Virus der 400. Passage, welches für Eintagsküken vollkommen avirulent ist. Virus der 270. und 347. Passage verhält sich intermediär.
4. Beim HP-1-Impfvirus der 194. Passage hängt der Impferfolg wie bei höher attenuiertem Impfvirus weitgehend von der Impfdosis ab. Eine zweimalige Gabe von etwa $10^{6,5}$ KID₅₀ führt zu einem kompletten Immunschutz der Impflinge.
5. Virus der 194. Passage ist auch bei starker Oberdosierung unschädlich für die Impflinge. Es kommt zu keiner zyklischen Infektion. Virus wird vorübergehend über den oberen Verdauungstrakt ausgeschieden. Eine Kontagiosität des ausgeschiedenen Virus für empfängliche Kontakttiere fehlt jedoch. Insofern liegen keine epizootologischen Bedenken vor, attenuiertes HP-1-Virus ab d. 200. Passage für die Hühnerpockenimpfung zu verwenden.

6. Eine routinemäßige Impfung mit dem HP-1-Impfvirus ist in Großbetrieben möglich. Die Intensivhaltung beeinträchtigt die Unschädlichkeit der Impfung nicht. Eine orale Hühnerpockenimpfung läßt sich gut im Rahmen der üblichen Impfungen gegen andere Geflügelerkrankungen durchführen und beeinflußt deren Wirksamkeit nicht.

Auf sorgfältige technische Durchführung der Trinkwasserimpfung muß geachtet werden.

7. Für den Praxiseinsatz wird die Verwendung von HP-1-Virus der 200. - 270. Zellkulturpassage in einer Dosierung von zweimal $10^{7,0}$ KID₅₀ pro Tier vorgeschlagen.

Für die Unschädlichkeits- und Wirksamkeitsprüfungen von Geflügelpocken-Trinkwasservakzinen ergeben sich folgende neue Gesichtspunkte:

1. Bei der Unschädlichkeitsprüfung sollten die vollkommene Avirulenz bei oraler Verabreichung in extrem hohen Dosen sowie die fehlende Kontagiosität als Kriterien gewertet werden.
2. Das Ergebnis der Testinfektion wird stark von der zum Challenge eingesetzten Virusmenge bestimmt. Entsprechende Richtlinien für die Wirksamkeitsprüfung von Hühnerpocken-Trinkwasservakzinen wurden erarbeitet.

Summary

The success of an oral vaccination against fowl pox depends on a number of factors. It is influenced positively or negatively by the vaccine itself, the vaccination technique, the recipient of the vaccine and the environment. This dissertation is a contribution to these problems. In addition to already known interactions the following relations have been worked out:

1. Chickens can be immunized successfully against fowl pox at the youngest age. This applies also for animals from herds that are continuously vaccinated against fowl pox.
2. Vaccination via the drinking water with HP-1 vaccine virus induces protection also against heterologous field strains.
3. The virulence of the HP-1 vaccine strain for one day old chickens diminishes more rapidly with increasing attenuation in cell cultures than its immunogenicity. Virus material of the 194th chick embryo fibroblast passage leads to a generalized disease and to mortality in one day old chickens, however, is about ten times stronger as drinking water vaccine, which is avirulent for one day old chickens. Virus of the 270th and 347th passage show reactions between the above extreme values.
4. The success of a vaccination using HP-1 vaccine virus of the 194th passage depends on the vaccine dose similar to higher attenuated virus. A complete immune protection is obtained by two doses of about $10^{6,5} \text{TCID}_{50}$.
5. Virus of the 194th passage is harmless for recipient even after administration of high overdoses. No cyclic infections occur. Virus is excreted temporarily via the upper digestive tract, and is not contagious for susceptible contact animals. Insofar there are no epizootologic barriers to use attenuated HP-1 virus for a fowl pox vaccination at levels of the 200th cell culture passage.

6. A routine vaccination is possible also on large farms. The safety of the vaccine is not influenced by intensive management methods. An oral vaccination against fowl pox is possible in connection with the usual vaccinations against other infectious fowl diseases and has no effect on their efficacy.

Attention must be paid to exact technical application of the vaccine via the drinking water.

7. For practical use HP-1 virus between the 200th and 270th cell culture passages is suggested with two doses of $10^{7,0}$ TCID₅₀ each per animal.

For testing the safety and efficacy of vaccination via the drinking water against fowl pox the following new aspects arise:

1. For testing the safety the criteria should be complete avirulence on the virus after administration in extremely high doses and the missing contagiousness.
2. Results of the test infection depend upon the quantity of virus used for challenge. Corresponding instructions are worked out for testing the efficacy of fowl pox vaccines administered via the drinking water.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALLER, B., und W.H. ALLAN, 1969: (Vaccination against Newcastle Disease with LaSota strain. Results of administering different doses of virus in the drinking water). Revta Patron. Biol. anim. 13, 5-9 (zit. nach Vet.Bull. 40, 110, 1970)
- ALLER, B., und W.H. ALLAN, 1970: (Stability of LaSota strain of Newcastle Disease virus in drinking water). Sup. cient. Cons. gen. Col. vet. Esp. 188, 3-6 (zit. nach Vet.Bull. 41, 475, 1971)
- ANDRE, V., 1966: Zur Sprayimpfung der Hühner gegen Newcastle Disease. Dt. Tierärztl. Wschr. 73, 279-281.
- BALDELLI, B., 1956: Studio della immunita nei polli vaccinati contro la pseudopeste con virus attenuato introdotto per via orale. Atti Soc.ital.Sci.vet. 10, 729-736.
- BALLA, L. und J. CSALAVA, 1968: (Versuche zur Steigerung der Wirksamkeit und zur Vereinfachung der Immunisierung gegen Geflügelpest und großbetrieblichen Verhältnisse. Magy. Allatorv. Lap. 23, 91-95. (zit. nach Landw. Zbl. IV, 14, 1112, 1969)
- BALLA, L., J. KOJNOK, L. PAPOCSI, M. SZ. PITRON und M. SZEDÖ, 1967: (Experiments with various strains of avian infectious Bronchitis virus). Magy. Allatorv. Lap. 22, 563-565. (zit. nach Vet. Bull. 38, 784, 1968)
- BANKOWSKI, R.A., R. CORSTVET und J. FABRICANT, 1958: A tissue culture-modified Newcastle Disease virus. II. Immunogenicity of live tissue culture-modified Newcastle Disease virus in chickens. Avian Dis. 2, 227-240.

- BANKOWSKI, R.A., R.W.HILL und L.G.RAGGI, 1957: Response of eight weeks old susceptible chickens to Newcastle disease (B1) and infectious bronchitis virus. Avian Dis. 1, 195-207.
- BANKOWSKI, R.A. und J. KINJO, 1965: Tissue culture systems with Newcastle disease virus and relationship of antigenicity to immunogenicity among strains. Avian Dis. 9, 157-170.
- BASSIOUNI, A.H., 1961: Untersuchungen zur Frage des Zeitpunktes der Antikörperbildung bei verschieden alten Küken. Vet. med. Diss. Gießen.
- BEARD, CH.W., und B.C. EASTERDAY, 1967a: The influence of the route of administration of Newcastle Disease virus in host response. I. Serological and virus isolation studies. J. Infect. Dis. 117, 55-61
- BEARD, CH.W., und B.C. EASTERDAY, 1967b: The influence of the route administration of Newcastle Disease virus in host response. II. Studies on artificial passive immunity. J. infect. Dis. 117, 62-65.
- BEARD, CH.W., und B.C. EASTERDAY, 1967c: The influence of the route administration of Newcastle Disease virus in host response. III. Immunofluorescent and histopathological studies. J. infect. Dis. 117, 66-70.
- BEAUDETTE, F.R., und J.A. BIVIAN, 1953: The influence of passive immunity on the response to intramuscular and intranasal administration of Newcastle disease virus. Cornell Vet. 43, 513-531.
- BECKER, W., und H.J. BENGELSDORFF, 1966: Klinische Erfahrungen bei der Schutzimpfung mit Resprovac gegen die Infektiöse Bronchitis. Dt. Tierärztl. Wschr. 73, 31-35.

- BENGELSDORFF, H.J., 1965: Experimentelle Erfahrungen mit Versuchsvaccinen gegen Infektiöse Bronchitis der Hühner. Dt. Tierärztl. Wschr. 72, 193-201.
- BENGELSDORFF, H.J., 1971: Impfschutz und Antikörperbildung nach kombinierter Anwendung von Newcastle Disease und Infektiöser Bronchitis-Vaccine. Die Blauen Hefte für den Tierarzt 45, 183-190.
- BENGELSDORFF, H.J., und D. BERNHARDT, 1972: Experimentelle Untersuchungen über die Trinkwasserimpfung mit lyophilisierter Lebendvaccine gegen Aviäre Encephalomyelitis. Die Blauen Hefte für den Tierarzt 48, 387-391.
- BENGELSDORFF, H.J., und O. JAEGER, 1965: Beziehungen zwischen dem Auftreten haemagglutinationshemmender und praezipitierender Antikörper bei Hühnern nach Verabreichung von Newcastle Disease-Virus. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 169, 1-12.
- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1962a: Untersuchungen über die Unschädlichkeit und das Immunisierungsvermögen von Hühnerpockenvirusstämmen bei Küken und Junghühnern. Mh. Tierheilk. 14, 175-188.
- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1962b: Zur Unschädlichkeit, Kontagiosität und Wirksamkeit eines Hühnerpocken-Impfvirusstammes. Die Blauen Hefte für den Tierarzt 3/4, 18.
- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1963a: Weitere Untersuchungen über Möglichkeiten einer Kombinationsimpfung gegen Newcastle-Disease und Geflügelpocken bei Küken. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 76, 255-258.
- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1963b: Vergleichende Untersuchungen über das Immunisierungsvermögen von Geflügelpest-Trinkwasservaccinen (Stamm B1) aus Ei- und Schweinenierenkulturen. Mh. Tierheilk. 15, 61-73.

- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1964a: Zur Frage der Impfprophylaxe gegen Infektiöse Bronchitis mit Lebendvaccine. I. Virulenzprüfung des Impfvirus. Dt. Tierärztl. Wschr. 71, 176-180.
- BENGELSDORFF, H.J., und B. SCHNEIDER, 1964b: Zur Frage der Immunprophylaxe gegen Infektiöse Bronchitis mit Lebendvaccine. II. Immunogenes Verhalten gegenüber verschiedenen Feldstämmen. Dt. Tierärztl. Wschr. 71, 202-207.
- BIJLENGA, G., 1956: Het infect bronchitis virus bij kuikens in Nederland, aangetoond met behulp van ei-enting, dierexperimenteel onderzoek en serumneutralisatieproeven. Tijdschr. Diergeneesk., 81, 43-54.
- BIJLENGA, G., 1960: Untersuchungen über die Wirksamkeit eines lebenden Impfstoffes gegen die Infektiöse Bronchitis der Hühner mit einem am bebrüteten Hühnerei adaptierten dem Trinkwasser zugefügten, autochthonen Virusstamm. Vet. med. Diss. Bern.
- BINAGHI, C., D. CESSI und A. POGGI, 1955: La vaccinazione d. pulcini con virus di Newcastle apatogeno (ceppo F) nell' acqua da bere. Atti.Soc.ital.Sci. vet. 9, 569-572.
- BLAXLAND, J.D., und A.J. McLEOD, 1969: Observations on the use of live infectious bronchitis vaccine under field conditions. IVth. Congr.World.Vet.Poultry Ass., Belgrade 30-31,
- BOJADZIEV, S. 1967:(Die Pathogenese und Immunogenese der Pseudogeflügelpest).Vet. Med. nauki, Sof. 4, 13-17, (zit. nach Landwirt. Zentralbl. IV, 13, 2095, 1968).
- BOJADZIEV, S., und N. STOILOVA, 1966:(Der Einfluß der Antigenmenge und der Häufigkeit des Infizierens auf die Immunogenese bei der Newcastle Disease). Vet. Med. nauki, Sof. 3, 779-784 (zit. nach Landwirt. Zentralbl. IV, 13, 588, 1966).

- BORNSTEIN, S., A. RAUTENBERG-ARAZI und Y. SAMBERG, 1952a: Some aspects of congenital passive immunity to Newcastle disease in chicks. I. The transfer of haemagglutinin inhibitors from maternal yolk to the chick. Am.J.vet.Res. 13, 373-378.
- BORNSTEIN, S., A. RAUTENBERG-ARAZI und Y. SAMBERG, 1952b: Some aspects of congenital passive immunity to Newcastle disease in chicks. II. The relationship of maternal haemagglutination-inhibition titers in baby chicks to their actual immunity. Am.J.vet.Res. 13, 379-382.
- BOSGRA, O., und J.H.G. ROERINK, 1961: Praktijkproef met een levend avirulent pseudo-vogelpest (stam B1) een infectieuze bronchitis drinking water-vaccin. Tijdschr. Diergeneesk. 86, 1198-1209.
- BOSGRA, O., und J.H.G. ROERINK, 1962: Parenteral immunity in fowl pox and serum neutralization. Tijdschr. Diergeneesk. 87, 106-112.
- BOX, P.G., 1965: The influence of maternal antibody on vaccination against Newcastle disease. Vet.Rec. 77, 246-250.
- BOX, P.G., D.F. SANTOS und T.M. CHAIN, 1970: Response in chicken vaccinated with live infectious bronchitis vaccine to killed Newcastle disease vaccine. Vet. Rec. 87, 292-293.
- BRAN und Mitarbeiter, 1959: Zur Immunisierung von Küken mit dem avirulenten Pseudogeflügelpestvirus-Stamm B1). Veterin Casopsis 8, 209-219 (zit. nach Landwirt. Zentralbl. IV, 5 759, 1960).
- BRAN, L., I. SUHACI, R. URSACHE, u. E. POPA, 1958: (Vakzinierung d. Küken mit der B1-Vakzine gegen die atypische Geflügelpest. Probleme zootehn.veterin. 11, 48-55 (zit. nach Landwirt. Zentralbl. IV, 4, 940, 1959

- BRANDLY, C.A., H.E. Moses und E.L. JUNGHER, 1946: Transmission of antiviral activity via egg and the role of congenital passive immunity to Newcastle disease in chickens. Am.J.Vet.Res. 7, 333 - 342, 1946.
- BRANDLY, C.A., und G.L. DUNLAP, 1939: Immunization against fowlpox with fowl and pigeon pox viruses cultivated in vivo and in vitro. J.Am.Vet.Med.Ass. 95, 340.
- BRATT, M.A. und H. RUBIN, 1967: Spezifische Interferenz among strains of Newcastle disease virus. I. Demonstration and measurement of interference. Virology 33, 598-608.
- BRAUER, E.M., 1961: Zur Frage der Kükenimpfung mit Geflügelpocken-H-Impfstoff. Vet.Med.Diss.F.U.Berlin
- BOLOW, V., von, 1964: Untersuchungen über die aviäre Encephalomyelitis mit besonderer Berücksichtigung der Möglichkeit einer aktiven Immunisierung. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 77, 11-16.
- BOLOW, V., von, 1965: Aviäre Encephalomyelitis: Züchtung, Titrierung und Lagerung des AE-Virus für Lebendimpfstoff. Zbl. Vet.Med. B 12, 298-311.
- BOLOW, V., von, 1966: Infektiöse Bronchitis der Hühner I. Viruszüchtung in Zellkulturen aus Hühnerembryonieren. Zbl. Vet. Med. B 13, 345-363.
- BOLOW, V., von, 1966a: Infektiöse Bronchitis der Hühner. II. Änderung der Virusvirulenz nach Serienpassagen in Zellkulturen. Zbl. Vet. Med. B 13, 671-683.
- BOLOW, V., von, 1966b: Infektiöse Bronchitis der Hühner. III. Vergleichende Untersuchungen der Virulenz und Wirksamkeit von vier Lebendvakzinen. Zbl. Vet. Med. B 13, 767-781.

BOLOW, V., von, 1967: Untersuchungen über den Neutralisationstest bei der infektiösen Bronchitis der Hühner. Zbl. Vet. Med. B 14, 321-342.

BOLOW, V., von, 1969: Differenzierung von Feldstämmen des Hühner-Bronchitisvirus (IBV). Zbl. Vet. Med. B 16, 414-427.

BOLOW, V., von, G. MONREAL und R.J. LORENZ, 1963: Untersuchungen zur Methodik und Leistungsfähigkeit des Embryo-Empfänglichkeitsschutztestes bei der infektiösen Encephalomyelitis der Hühner (AE). Zbl. Vet. Med. B 10, 528-561.

BURTSCHER, H., K. KÖHLER und R. SWOBODA: Zur Schutzimpfung gegen Aviäre Encephalomyelitis. Wien.Tierärztl.Wschr. 54, 835-842.

CALNEK, B.W., und H. JEHNICH, 1959a: Studies on Avian Encephalomyelitis. I. The use of serum-neutralization test in detection of immunity levels. Avian. Dis. 3, 95-104.

CALNEK, B.W., und H. JEHNICH, 1959b: Studies on Avian Encephalomyelitis. II. Immune response to vaccination procedures. Avian. Dis. 3, 225-239.

CALNEK, B.W., P.J. TAYLOR und M. SEVOIAN, 1960: Studies on Avian Encephalomyelitis. IV. Epizootologie. Avian.Dis. 4, 325-347.

CALNEK, B.W., P.J. TAYLOR und M. SEVOIAN, 1961: Studies on Avian Encephalomyelitis V. Development and application of an oral vaccine. Avian. Dis. 5, 297-312.

CALNEK, B.W., P.D. MCKERCHER, R.E. LUGINBUHL und H. van ROEKEL, 1961a: Committee report on a tentative program for the control of Avian Encephalomyelitis. Avian. Dis. 5, 456-460.

- CAPORALE, G., F. GRAMENZI und N.M. LARIN, 1963: The immune response of chickens vaccinated with tissue culture Newcastle disease vaccine (F or Valencia) which have been administered through the drinking water. Kongreßberichte XVII. Welttierärztekongreß Hannover 2, 1483-1484.
- CHERBY, J., 1967: Immunisation du poisson au cours des trois premières semaines de vie contre la maladie de Newcastle à l'aide de vaccins à virus vivant, Bull.Soc.Sci.vét. Méd.comp. Lyon, 69, 209-223.
- CHERBY, J., u. J. ROGIER, 1966: Vaccination contre la bronchite infectieuse des poules pondeuses en cours de ponte. Revue.méd.vét. 117, 131-138.
- COETZEE, L., und L. ABRAMS, 1965: Respiratory virus diseases of fowes in South Africa. Bull.Off.int.Epiz. 64, 733-740.
- CREANGA, E., A. ELEFTERESCU, F. DAN und M. BALACI, 1966: Die Wirksamkeit der Impfung von Hühnerküken mit der lentogenen Vakzine B1. Die Korrelation der parenteralen Immunität und der antigenen postvakzinalen Beantwortung. Serologische Aspekte. Lucr.Inst.Cerc.Vet.Bioprep. Pasteur-Buc. 3, 31-44 (zit. nach Landwirtsch. Zentralbl. IV, 12, 2531 1967).
- DANNER, K., und A. MAYR, 1972: Perorale Immunisierung gegen Pocken III. Beziehungen zwischen Impfdosis und Impferfolg bei der Trinkwasservakzinierung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten Stamm HP-1. Zbl.Vet.Med. B 19, 609-614.
- DARDIRI, A.H., P.W. CHANG und D.E. FRY, 1957: Immunity study of three types of Newcastle disease vaccine for broilers caponets. Am.J.vet.Res. 18, 400-404.

- DAVIS, R.B. 1956: M.S. thesis A. and M. University of Texas, College Station (zit. nach von BÖLOW, 1966a).
- DOLL, E.R., W.H. McCOLLUM u. M.E. WALLACE, 1950: Immunization of chicks hatched from hens immunized against Newcastle disease. Vet. Med. 45, 365-369.
- DORN, P., 1971: Handbuch der Geflügelkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- DORN, P., und O. KRONTHALER, 1964: Beobachtungen bei Durchseuchung von Zuchtherden mit dem Erreger der Aviären Encephalomyelitis. Arch. Geflügelk. 28, 49-56.
- DORN, P., und O. KRONTHALER, 1963: Untersuchungen über die Immunität gegen Aviäre Encephalomyelitis in bayerischen Geflügelzuchten. Zbl. Vet. Med. B 10, 400-407.
- DORN, P., H. SEIDL und E. WESSLING, 1973: Vergleichende Untersuchungen zum Antikörpernachweis gegen Newcastle Krankheit im Serum und Eidotter legender Hennen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 86, 349-350.
- DORN, P., und P. SCHINDLER, 1970: Zur Vaccination gegen Aviäre Encephalomyelitis (AE) bei Endprodukt-Junghennen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 83, 320-322.
- DUEE, J.P. u. G. MOINE, 1964: Trois cas de maladie de Newcastle é voluant dans des circonstances diverses apres vaccination avec la souche Hitchner B1. Essai de caractérisation des souches isolées. Recl. Méd. vét. Ec. Alfort 140, 859-870.
- EDWARDS, J.L., T. ZAWROCKA-WRZOLEK u. J. KREBS, 1968: The primary antibody response in the neonatal chick. Lab. Invest. 19, 627-634, 1968 (zit. Vet. Bull. 39, 491, 1969).

- ElSSNER, G., 1963: Die Prüfung der Wirksamkeit von Geflügelpockenimpfstoffen. Kongreßberichte XVII Welttierärztekongreß Hannover 2, 1391-1395.
- ElSSNER, G., und R. SIEGERT, 1965: Die Wertbemessung von Impfstoffen zur aktiven Schutzimpfung gegen atypische Geflügelpest. I. Immunisierungsversuche an Hühnern und kleinen Laboratoriumstieren. Mh.Tierheilk. 7, 205-217.
- ElSSNER, G., 1965: Grundsätzliche Methoden zur Prüfung von Impfstoffen gegen Geflügelkrankheiten. Berl.Münch.Tierärztl. Wschr. 78, 152-156.
- EMMERLING, P., H. FINGER und L. EISELE, 1970: Hemmung der sekundären 7S-Antikörperbildung durch Antikörper-induzierte Unterdrückung der immunologischen Primärreaktion. Ztschr.Med.Mikrobiol.Immunol. 156, 70-85.
- FAHEY, J.E., und J.F. CRAWLEY, 1956: Propagation of infectious bronchitis virus in tissue culture. Can.J.Microbiol. 2, 503-510.
- FOMINA, A.JA., P.J.FEOKTISSTOW, L.M. KONTRIMAVICIUS und K.A. KORTENEW, 1958:(Neue Methoden zur Immunisierung von Küken und Hennen gegen die Hühnerpest).(Geflügelzucht), 11, 33-35 (russisch) (zit. nach Landwirtsch. Zentralbl. IV, 5, 358, 1960).
- FRENCH, E.L. und T.D.St. GEORGE, 1965: The growth and neutralisation of Newcastle disease virus in BHK 21 tissue. Aust.J. exp.Biol.med.Sci. 43, 371-380.
- FRITZSCHE, K., 1960: Stand und Ziel der Bekämpfung der bedeutendsten Krankheiten der Atmungswege der Hühner. Dt. Geflügelwirtschaft. 12, 348-359.

- FRITZSCHE, K., M. STUMPEL, L. TOUCAS und L. BILLON, 1969: Vergleichende Untersuchungen über die Pathogenität, die Histopathogenese und das Immunisierungsvermögen von zwei attenuierten Virusstämmen der Infektiösen Bronchitis der Hühner. Zentralbl.Vet.Med., B 16, 193-212.
- GAGLIARDI, G. 1953: La vaccinazione per via orale contro la pseudopeste dei polli. Atti.Soc.ital.Sci. vet. 7, 911-917.
- GALE, C., D.I. GARD, E.E. OSE, u.R. BERKMANN, 1965: Evaluation of tissue-culture Newcastle disease vaccine. Avian.Dis.9, 348-359.
- GEHRING, K., 1958: Prüfung einer holländischen Trinkwasservaccine (Lebendvaccine) gegen die atypische Geflügelpest im Vergleich mit Adsorbat-Vaccine. Mh.Tierheilk. 10, 55-66.
- GEHRING, K., und E. GEISS, 1958: Ein Verfahren zur quantitativen Wertbemessung von Geflügelpestimpfstoffen. Mh.Tierheilk. 10, 123-156.
- GEISSLER, H., und R. KROGER, 1963: Die Immunisierung gegen Newcastle Krankheit mit Lebendvakzine (Sammelreferat). Dt. Tierärztl.Wschr. 70, 52-56.
- GENTRY, R., 1962: Recent developments in the control of avian encephalomyelitis. 11th Ann.Univ. of New Hampshire, Poultry, Health Conference.
- GHEORHIN I., und L. Nitoin, 1962: Immunization of poultry against Newcastle disease in relation to the environmental temperature. Lucr.Inst.Cerc.Vet.Bioprep.Pasteur-Buc., 1, 411-423 (zit. nach Vet.Bull. 36, 152, 1966).
- GILL, T.J., u.H. KUNZ, 1971: Genetic and cellular factors in the immune response. II. Evidence for the polygenic control of the antibody response from further breeding studies and from pedigree analyses. J.Immunol. 106, 980-992.

- GILL, T.J., H.W. KUNZ, D.J. STECHSCHULTE und F.K. AUSTEN, 1970: Genetic and cellular factors in the immune response. I. Genetic control of the antibody response to Poly Glu⁵² Lys³³ Tyr¹⁵ in the inbred rat strains ACI and F 344. J.Immunol. 105, 14-28.
- GOOD, R, und B.W. PAPERMASTER, 1964: Ontogeny and phylogeny of adaptive immunity. Advanc.Immunol. 4, 1-115.
- GORET, P., J. AYCARDI, CH. PILET u. Y. GUILLAUME, 1958: Recherches experimentales et pratiques sur l'immunisation contre la maladie de Newcastle à l'aide d'un virus-vaccin buvable (souche Hitchner B1). Bull.mens.Soc.vét. prat.Fr. 42, 426-444.
- GRAMENZI, F., 1964:(Importance of containers for administration of live Newcastle disease vaccines in the drinking water) Atti Soc.ital.Sci.vet. 18, 679-683 (zitiert nach Vet. Bull. 35, 438, 1965).
- GRATZL, E., und H. KÖHLER, 1968: Spezielle Pathologie und Therapie der Geflügelkrankheiten. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1968.
- GRAUSGRUBER, W., R. KISSLING und F. GERSTL, 1967: Infektiöse Laryngotracheitis des Geflügels in Österreich. Wiener Tierärztl.Wschr. 54, 3-15.
- GRUN, J., und C.B. HUDSON, 1964: Vaccination for Newcastle disease in drinking water with LaSota strain in relation to dosage and revaccination with homologus and heterologus strains. Poultry Sci. 43, 825-830.
- GYLSTORFF, I. 1966: Anwendung von Arzneimitteln und Impfstoffen beim Geflügel. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 79, 405-409.

- GYLSTORFF, I., und H. KRAUSS, 1964: Die Immunisierung gegen aviäre Encephalomyelitis mittels künstlicher Durchseuchung (Bericht über einen Großversuch). Zbl.Vet.Med. B 11, 161-179.
- HAMANN, I., 1960: Untersuchungen zur Prüfung von Geflügelpockenimpfstoffen. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 73, 193-195.
- HANSON, R.P., 1956: An intracerebral inoculation test for determining the safety of Newcastle disease vaccines. Am.J.Vet. Res. 17, 16-17.
- HANSON, L.E., F.H. WHITE und J.O. ALBERTS, 1956: Interference between Newcastle disease and infectious bronchitis viruses. Am.J.Vet.Res. 17, 294-298.
- HARTWIGK, H., und M. KRASSELT, 1959: Beziehungen zwischen Impfreaktion und Immunität bei Hühnerpocken. Mh.Tierheilk. 11, 227-236.
- HECHT, M., 1966: Infektiöse Bronchitis und Legeleistung in der Intensivhaltung. Die Blauen Hefte für den Tierarzt 31, 21-24.
- HEIDE, L., van der, M. STUMPEL und R. HEIN, 1967: Een onderzoek betreffende het effect van enten met levende entstoffen tegen infectieuze Bronchitis en Pseudo-Vogelpest bij slachtkuikens. Tijdsch. Diergeneesk. 92, 1250-1260.
- HERBERT, W.J., 1970: Veterinary Immunology. Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh.
- HERRLICH, A., 1965: Handbuch der Schutzimpfungen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- HEUSCHELE, W.P., und B.C. EASTERDAY, 1970: Local immunity and persistence of virus in the tracheas of chickens following infection with Newcastle disease virus. II. Immunofluorescent and histopathologic studies. J.infect.Dis. 121, 497-504.

- HIGGINS, D.A., 1971: The effect of parenteral immunity on the response of five days old chicks to intranasal vaccination with F strain Newcastle disease virus. Trop.Anim.Hlth. Product. 3, 1-13.
- HILBRICH, P., und U. REUSS, 1963: Immunitätsdauer nach konsekutiver Schutzimpfung gegen atypische Geflügelpest mit Hitchner B1-Vaccine und Adsorbatvaccine nach Traub. Berl.Münch. Tierärztl.Wschr. 76, 50-53.
- HILDEBRAND, G.J., und H. WOLOCHOW, 1962: Translocation of bacteriophage across the intestinal wall of the rat. Proc.Soc.exp.Biol.109, 183-185.
- HITCHNER, S.B., 1950: Further observation on virus of low virulence for immunizing fowls against Newcastle disease. Cornell Vet. 40, 60-70.
- HITCHNER, S.B., C.A. SHEA und P.G. WHITE, 1958: Studies on a serum neutralization test for the diagnosis of Laryngo-tracheitis in chickens. Avian.Dis. 2, 258-269.
- HITCHNER, S.B. und P.G. WHITE, 1955: Growth-curve studies chick embryo-propagated infectious bronchitis virus. Poultry Sci. 34, 590-594.
- HOCHSTEIN-MINTZEL, V., H.CHR. HUBER und H. STICKL, 1972: Die orale und nasale Immunisierung mit Poxvirus vaccinia. III. Tierexperimentelle Untersuchungen. Zbl.Bakt. Hyg., I.Abt., Orig. B 156, 30-96.
- HOEKSTRA, J., 1959: Vaccination against respiratory diseases in chickens in the Netherlands. XVI Int.Tierärztl.Kongr.Madrid, 2, 341-343.
- HOEKSTRA, J. 1964: Experiments with Avian Encephalomyelitis. Brit.Vet. J. 120, 322-335.

- HOEKSTRA, J., 1966: Vortrag 6. Arbeitstagung Fachgemeinschaft "Geflügelkrankheiten" der Deutsch.Vet.Med.Gesellschaft, Gießen.
- HOEKSTRA, J., und B. RISPENS, 1960: Infectieuze bronchitis bij pluimvee. I. Laboratorium experimenten met een sterkwerkende stam. Tijdschr.Diergeneesk. 85, 279-284.
- HOEKSTRA, J., und B. RISPENS, 1960a: Infectieuze bronchitis bij pluimvee. II. Praktijkervaringen met de sterkwerkende entstof. Tijdschr.Diergeneesk. 85, 320-330.
- HOEKSTRA, J., u. B. RISPENS, 1960b: Infectieuze bronchitis bij pluimvee. De ontwikkeling van een mildwerkend vaccin. Tijdschr. Diergeneesk. 85, 398-403.
- HOFFMANN, M., 1965: Tierversuche zur Schleimhautpassage und Resorptionsvirämie von T3-Phagen nach oraler, trachealer und rektaler Gabe. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. Orig. 198, 371-390.
- HOFSTAD, M.S., 1956: Immunisation of chickens against infectious bronchitis using an embryo-passaged attenuated strain of virus. Vet.Med. 51, 464-468.
- HOFSTAD, M.S., 1967: Immunity following aerosol exposure to high-embryo-passage avian infectious bronchitis virus. Avian.Dis. 11, 452-458.
- HOFSTAD, M.S. und H.W. YODER, 1966: Avian infectious bronchitis virus distribution in tissues of chicks. Avian.Dis. 10, 230-240.
- HUYGELEN, C. 1965: (Properties of the K.T. vaccinal strain of Newcastle disease virus). Recl. Méd. vét. Ec. Alfort, 141, 975-981 (zit. nach Vet. Bull. 36, 366, 1966).
- HUYGELEN, C., J. PEETERMANS und G. COLINET, 1964: Le titre immunisant minimum de vaccins oraux la pseudopeste aviaire. Annls Méd.vét. (Bruxelles) 108, 101-105.

- JANSSEN, W., und H. LODERS, 1971: Vergleichende Untersuchungen über die Entwicklung hämagglutinationshemmender Antikörper nach Vakzination gegen Newcastle Disease mit den Stämmen LaSota und Hitchner B1 sowie deren Verträglichkeit im Feldversuch. Dtsch.Tierärztl.Wschr. 78, 579-581.
- JASCENKO, A.P., 1970:(Untersuchungen über den Einfluß von Eiweißverdünnern auf einige immunologische Faktoren bei der oralen Vakzination von Broilern gegen Pseudopest). Sb.Rab.mol. ucyenych. Moskva 12, 235-238. (zit. nach Landwirt. Zentralbl. IV, 16, 1883, 1971).
- JUNGHERR, E.L., T.W. CHOMIAK und R.E. LUGINBUHL, 1956: Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proc. 60. Annls Meeting U.S. Livest. San. Ass., Chicago, 203-209.
- JUNGHERR, E.L., und F.S. MARKHAM, 1961: Relationship between a Puerto Rican Epizootic and the B1-strain of Newcastle disease virus. Poultry Sci. 40, 1419, (Abstract).
- JUNGHERR, E.L., und N.L. TERRELL, 1948: Naturally acquired passive immunity to infectious bronchitis in chicks.Am.J. vet.Res. 9, 201-205.
- KALETA, E.F., 1972: Kinetik der NDV-spezifischen Antikörper in Hühnern. III. Elimination der maternalen Antikörper der Hühnerküken. Dt. Tierärztl. Wschr. 79, 184-187.
- KALETA, E.F. und O. SIEGMANN, 1971: Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis haemagglutinationshemmender und virusneutralisierender Antikörper nach Vaccination gegen Newcastle Disease. Archiv Geflügelk. 35, 79-83.
- KARBER, G., 1931: Beitrag zu kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch.Exp.Path.Pharmakol. 162, 480-483.

- KARZEWSKI, W., A. CAKALA und H. RASZEWSKA, 1969: Suitability of Komarov strain of Newcastle disease virus for immunization of chicks. *Medycyna wet.* 25, 646-649 (zit. nach *Vet.Bull.* 40, 711, 1970).
- KENTRUP, J., 1972: Feldversuche zur Immunisierung gegen Newcastle-Krankheit in Verbindung mit Immunitätskontrolle. *Med.vet.Diss. F.U. Berlin*
- KOHN, A., 1955: Quantitative aspects of Newcastle Disease virus infection - effect of route of infection on the susceptibility of chicks. *Am.J.vet.Res.* 16, 450-457.
- KONO, R., A. AKAO, W. SASAGAWA und Y. NOMURA, 1970: Studies on the local immunity of intestinal tract to chickens oral administration of Newcastle Disease virus. *Progr. Immunobiol. Standard*, 4, 330-332.
- KRAUSS, H., 1963: Moderne Impfmethode beim Geflügel - ein Erfahrungsbericht aus Amerika. *Dtsch.Tierärztl.Wschr.* 70, 104-109.
- KRAUSS, H., 1965a: Die Impfung gegen die Aviäre Encephalomyelitis. *Dtsch. Geflügelwirtsch.* 17, 51-52.
- KREJMER, JU. CH., 1969: (Immunität bei den mit lyophiler Virusvakzine aus dem Stamm LaSota geimpften Tieren). *Veterinarija, Moskva* 46, 47-49 (zit. nach *Landw. Zentralbl. IV*, 15, 1637, 1970).
- KROSLAK, U., J. HORVATH und V. RAJTAR, 1964: (Vergleich der Immunisierungswirkung der Vakzinationsviren F und B1) *Veterinarstvo (Zagreb)* 14, 315-319 (zit. nach *Landw. Zentralbl. IV*, 10, 1581, 1965).

- KROSLAK, U., und V. RAJTAR, 1964: (Einige Bemerkungen zur Immunprophylaxe gegen die Geflügelpest unter hiesigen Bedingungen). Veterinarstvo (Zagreb) 14, 17-19. (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 10, 232, 1965).
- KUDRIJAVCEV, F.S., Z.J. CISTOVA und V.N. SJURIN, 1965: (Einfluß der Impfmethode auf die Newcastle-disease-Immunität bei Küken). Veterinarija, Moskva, 42, 39-41 (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 11, 2359, 1966).
- KURUDIMOV, P., S. STOJCEV und B. RIBAROV, 1965: (Aerosolmethoden der Vakzinierung bei der Pseudopest des Geflügels. 2. Mitt. Vergleichsprüfung der Aerosol- und Oralmethode der Vakzinierung gegen Pseudopest des Geflügels mit B1-Stamm). Vet.Med. nauki, Sof. 2, 395-401. (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 11, 1692, 1966).
- LANDGRAF, H., und E. VIELITZ, 1970: Untersuchungen über den Impferfolg nach Anwendung verschiedener Impfprogramme und Virusarten bei der Geflügelpest. Dt. Tierärztl. Wschr. 77, 393-398.
- LANDGRAF, H., und E. VIELITZ, 1972: Versuche zur Immunisierung von Hühnerküken gegen atypische Geflügelpest (Newcastle Krankheit). Dt. Tierärztl. Wschr. 79, 493-500.
- LEVINE, P.P., und J. FABRICANT, 1950: Susceptibility to Newcastle infection of chicks with congenital serum antibodies. Cornell Vet. 40, 213-225.
- LITJENS, J.B., 1965: Praktijproef betreffende de toepassing van een entschema bij slachtkuikens. Tijdschr. Diergeneesk. 90, 1660-1669.
- LODERS, H., 1969: Gesichtspunkte bei der Massentherapie. Dt. Tierärztl. Wschr. 76, 68-71.

- LOTHGEN, W., 1971: Bildung haemagglutinationshemmender Antikörper gegen Newcastle Disease (atypische Geflügelpest) nach Vaccination mit Hitchner B1-Trinkwasser-Vaccine bei Käfighaltung, sowie der Einfluß auf die Legeleistung bei vollständig oder nicht geimpften Legehennen. Dt. Tierärztl. Wschr. 78, 539-542.
- LUGINBUHL, R.E., E.L. JUNGHER und T.W. CHOMIAK, 1955: Administration of Newcastle disease and infectious bronchitis vaccine through the drinking water. Poultry Sci. 34, 1399-1403.
- MAREK, K. und M. RASZEWSKA, 1959: (Orale Immunisierung von Hühnern mit dem Stamm F 107 gegen Geflügelpest). Medycyna wet. (Warszawa) 15, 341-343 (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 5, 358, 1960).
- MARKHAM, F.S., 1954: Newcastle Disease: A serologic study in vaccination and revaccination. Cornell Vet. 44, 324-345, 1954.
- MARKHAM, F.S., C.A. BOTTORFF und H.R. COX, 1951: The conjunctival application of Newcastle disease vaccine (intranasal type) in parentally immune and susceptible chicks. Cornell Vet. 41, 267-282.
- MARKHAM, F.S., H.R. COX und E. BERRM, 1961: Immunization with a mild strain of laryngotracheitis virus by various methods. Poultry Sci. 40, 1427 (Abstract).
- MARKOVITS, P., 1965: (Immunization against Newcastle Disease with culture or egg vaccine by the subcutaneous or oral route). Magy. Allatorv, Lap. 20, 557-559 (zit. nach Vet. Bull. 36, 801, 1966).
- MATSUKURA, T. 1970: A study of maternal immunity in chicks derived from flocks naturally infected with avian encephalomyelitis virus. Jap. J. vet. Res. 18, 93-94.

- MAYR, A., 1959: Geflügelpockenschutzimpfstoffe aus T- und H-Stämmen. Mh.Tierheilk. 11, 339-356.
- MAYR, A., 1960: Verhalten von Hühner-, Tauben- und Kanarienvirulen im Küken nach intravenöser Impfung. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., 178, 149-159.
- MAYR, A., 1961: Züchtung des NDV-Stammes Hitchner B1 in Zellkulturen aus Schweinenieren. Zbl. Vet. Med. B., 8, 201-213.
- MAYR, A., 1963: Lebendimpfstoffe gegen Viruserkrankungen der Tiere. Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. 191, 37-50.
- MAYR, A., und H. BUSCHMANN, 1967: Beziehungen zwischen Ernährung, Resistenz und Immunität bei Infektionskrankheiten. Tierärztl. Umschau, 22, 443-455.
- MAYR, A., und K. KALCHER, 1960: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur. Arch.Virusforsch. 10, 72-102.
- MAYR, A., und K. MALICKI, 1966: Attenuierung von virulentem Hühnerpockenvirus in Zellkulturen und Eigenschaften des attenuierten Virus. Zbl. Vet. Med. B 13, 1-13.
- MAYR, A., 1964: Über eine atypische, milde Verlaufsform der infektiösen Laryngotracheitis des Geflügels mit besonderer Berücksichtigung der Diagnose und Differentialdiagnose. Zbl.Vet.Med. B 11, 572-583.
- MAYR, A., M. RATH und K. DANNER, 1971a: Perorale Immunisierung gegen Pocken. 1. Mitteilung: Untersuchungen über eine Schluckimpfung gegen Hühnerpocken mit dem attenuierten H-Stamm HP-1. Zbl. Vet. Med. B 18, 347-358.
- MAYR, A., M. RATH und K. DANNER, 1971b: Perorale Immunisierung gegen Pocken. 2. Mitteilung: Untersuchungen über eine kombinierte Schluckimpfung gegen Hühnerpocken und Newcastle Disease. Zbl. Vet. Med. B 18, 441-448.

- MAYR, A., T.SCHLIESSER und W. MERK, 1969: Infektion- Infektionskrankheit - Seuche. Sonderdruck aus "Mitteilungen für Tierärzte", 22.
- MAYR, A., und G. WITTMANN, 1957: Zur Pathogenese der Hühnerpockeninfektion. III. Die Pathogenese der Geflügelpockeninfektion des Kükens. Mh. Tierheilk. 9, 44-53.
- MCCARTHY, K., und K.R. DUMBELL, 1961: Chorioallantic inoculation of eggs: An improved method. Virology 14, 488-489.
- MENASCE, J., 1968: Experimenti di vaccinazione contro il diffterovaiolo dei polli tramite l'acqua da bere. Vet. ital. 19, 495-508 und 509-521.
- MEYN, A., u. J. PETTE, 1961: Die immunisierende Wirksamkeit des auf Schweinenierenkulturen adaptierten Newcastle-Virusstammes Hitchner B1. Mh. Tierheilk., 13, 348-351.
- MICHAEL, A., 1970: Vaccination of chickens with combined vaccines against Newcastle disease and infectious laryngotracheitis. Refuah vet. 27, 138-143.
- MONREAL, G., 1971: Die Immunitätsbildung bei der Newcastle Krankheit und ihre Ausnutzung für die Prophylaxe. Prakt. Tierarzt 52, 614-616.
- MONREAL, G., V. KRAFT und J. BAUMER, 1972: Die minimale immunogene Dosis von lentogenen Newcastlevirus bei verschiedenen Infektionswegen. Berl.Münch.Tierärztl. Wschr. 85, 453-455.
- MONREAL, G., H.-M. OPITZ und V. KRAFT, 1971: Untersuchungen über die Minimaldosis von Newcastle-Trinkwasserimpfstoffen. Tierärztl. Umsch. 26, 575-580.
- MONTI, G., 1964: Pseudopeste - la vaccinazione dei pulcini per via oculo-nasale e nell 'acqua da bere. Clin.veterin. (Milano) 87, 161-163.

- MOREIN, B., 1970: Immunity against Parainfluenza-3-virus in cattle: IgA in nasal secretions. Int. Archs. Allergy. appl. Immun. 39, 403-414 .
- NISHIMURA, Y., H. KAWASHIMA und N. KOYAMA, 1965: Studies on Newcastle disease living vaccine II. Time of development of immunity and distribution of vaccine virus in the body of vaccinated birds. J. Japan vet. Med. Ass. 18, 636-640.
- NITZSCHKE, E., und E. SCHMITTDIEL, 1960: Über die Unterscheidung und Charakterisierung von Virusstämmen der Newcastle Krankheit. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 73, 148-150.
- OBRESKOW, K., D. SAVOV und R. STOJCEV, 1964: Rezultati ot peroraluoto prilozenie na vaksina srestu pseudocuma po pticite stam LaSota. Vet.Med. nauki, Sof. 1, 3-8.
- PAGE, C.A., und C.H. CUNNINGHAM, 1962: The neutralization test for infectious bronchitis virus. Am.J.vet.Res. 23, 1065-1071.
- PAPARELLA, V., 1962: Ricerche comparative - nelle condizioni della pratica - sulla vaccinazione antipseudopesta con virus vivi attenuati somministrati nell 'acqua da bere o per via nasale. Zooprofilassi 17, 329-350.
- PETTE, J., 1961: Untersuchungen über einige biologische Eigenschaften und über die immunisierende Wirksamkeit des Newcastle-Virusstammes Hitchner B1 nach Dauerpassage in Schweinenierenkulturen. Mh.Tierheilk. 13, 184-190.
- PLACIDI, L., 1956: Accidents consécutifs à la vaccination contre la maladie de Newcastle. Influence de la température ambiante. Rôles respectifs du vaccin et de l'hoste. Bull.Off.int.Epizoot. 45, 393-408.

- PRIGGE, R. und W. SCHAFER, 1939: Methoden der Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen. Arch.exp.Path.Pharm. 191, 281.
- PROKOFJENA, M.T., I.N. DOROSCHKO und I.A. BUCCHARIN, 1959: (Ober neue Methoden der Vaccinierung gegen Geflügelpest). Wiss.Arb., ukrain. Forsch.-Inst. exp. Vet. Med. 25, 161-173 (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 6, 1135, 1961).
- PULSFORD, M.F., 1963: Infectious Laryngotracheitis of poultry. Vet. Bull. 33, 415-420 und 477-483.
- RAETTIG, H.J., 1963: Tierexperimente zur Durchlässigkeit des Intestinaltraktes für Virus. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 191, 97-104.
- RAETTIG, H.J., 1964: Tierexperimente zur Resorptionsvirämie. Zbl.Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 192, 534-538.
- RAETTIG, H.J., 1967: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 3. Mitteilung: Dosierung und Impfrhythmus bei der spezifischen Impfung der Maus gegen Salmonellen-Enteritis. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt., Orig. 203, 478-491.
- RAETTIG, H.J., 1971: Die orale Impfung mit inaktivierten Mikroorganismen. Zehn Jahre Forschungsarbeit im Robert Koch-Institut. Bundesgesetzblatt, 14, 141-147.
- RAETTIG, H.J., 1971a: Infektionsprophylaxe der Zukunft. Umschau 71, 937-938.
- RAETTIG, H.J., und B. GANZE, 1971: Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 14. Mitteilung: Aktive und passive Immunisierbarkeit von Babymäusen gegenüber S.typhi murium-Infektion. Zbl. Bakt., I. Abt., Orig. A, 218, 310-319.

- RAGGI, L.G., 1958: A note on survival time of an infectious bronchitis virus at various pH in distilled water. *Poultry Sci.* 37, 1464-1465.
- RAGGI, L.G., 1961: The present status of infectious bronchitis vaccines. *J.Am.vet.Med.Ass.* 138, 387-390.
- RAGGI, L.G., und R.A. BANKOWSKI, 1956: Study of some commercially available infectious bronchitis vaccines. I. Response of chicken to seven infectious bronchitis vaccines. *Am.J.vet.Res.* 17, 523-530.
- RAGGI, L.G., und G.G. LEE, 1957: Relationship between immunity and serum-neutralization titers in chickens inoculated with three infectious bronchitis vaccines. *Am.J.vet.Res.* 18, 740-742.
- RAGGI, L.G., und G.G. LEE, 1958: Influence of age and congenital immunity upon immunization with an avian infectious bronchitis vaccine. *J. Immunol.* 81, 155-161.
- RAGGI, L.G., und G.G. LEE, 1965a: Duration of immunity to infectious laryngotracheitis. *Poultry Sci.* 44, 509-514.
- RAGGI, L.G., und G.G. LEE, 1965b: Lack of correlation between infectivity serologic response and challenge results in immunization with an avian infectious bronchitis vaccine. *J. Immunol.* 94, 538-543.
- RATH, M. 1971: Experimentelle Untersuchungen über eine Trinkwasser-Schutzimpfung gegen Hühnerpocken. *Vet.Med.Diss.München*
- REUSS, U., und P. HILBRICH, 1960: Versuche zur Immunitätsübertragung durch den Eidotter und ihre Bedeutung für die vorbeugende Bekämpfung der atypischen Geflügelpest. *Mh. Tierheilk.* 12, 210-214.
- RICHEY, D.J., und S.C. SCHMITTLE, 1962: The effect of congenital passive immunity levels on the response of chicks to Newcastle disease vaccination. *J. Immunol.* 89, 344-347.

- RICHEY, D.J., und S.C. SCHMITTLE, 1964: Susceptibility to intratracheal administration of mesogenic Newcastle disease virus of broilers immune to intramuscular velogenic-type challenge. *Am.J.vet.Res.* 25, 1220-1225.
- RICHTER, J., 1958: Een dierexperimentaal onderzoek naar de immuniserende waarde van een enkelvoudige en met pseudovogelpest gecombineerde vaccinatie tegen infectieuze bronchitis van kippen. *Tijdschr. Diergeneesk.* 83, 46-62.
- ROEKEL, H., van, K.L. BULLIS, K.M. CLARKE, O.M. OLESINK und F. SPERLING, 1950: Infectious bronchitis. Massachusetts Agr.Exp.Station. Amherst, Mass. USA, Bulletin 460.
- ROSSI, G.A., und C. ACCIARI, 1968: Attenuazione di un ceppo velogeno del virus di Newcastle mediante passaggi seriali su cellule della linea BHK 21. *Atti Soc. ital. Sci. vet.* 22, 882-886.
- RUNDFELDT, H., O. SIEGMANN, E.F. KALETA und A. LODERS, 1968: Statistisch abgesicherte Erfolgskontrolle nach Geflügelpocken-Schutzimpfungen. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 75, 589-595.
- RUSSEFF, CH., und G. MITEFF, 1956: Préparation d' un vaccin contre la maladie de Newcastle avec la souche "F" et vérification de son innocuité. *Bull.Off.int.Epizoot.* 45, 409-414.
- RUSSEFF, CH., und G. MITEFF, 1957: La vaccinazione contro la pseudopeste dei polli per aerosol e per via orale in Bulgaria. *Zooprofiliassi* 12, 920-925.
- SAMBERG, Y., E. CUPERSTEIN, U. BENDHEIM und L. ARONOVICI, 1971: The development of a vaccine against infectious laryngotracheitis. IV. Immunization of chickens with a modified laryngotracheitis vaccine in the drinking water. *Avians. Dis.* 15, 413-417.
- SATO, S., J. NONOMURA, F. SHIMIZU, S. SHOYA und T. HORIUCHI, 1970: Mixed infection with *Mycoplasma gallisepticum* and B1 strain of Newcastle disease virus in chickens. *Natn.Inst.Anim.Hlth.Q.Tokyo.* 10, 58.

- SCHAAF, K., 1958: Immunization for the control of avian encephalomyelitis. Avian Dis. 2, 279-289.
- SCHMIDT, U., 1959: Ober die immunisierende Wirkung des gefriergetrockneten B1-Geflügelpestvirus. Arch.exp.Vet.Med. 13, 982-991.
- SCHMITTLE, S.C., 1950: Studies of Newcastle Disease IV. Comparison of Newcastle disease antibody titers in blood and egg yolk as measured by haemagglutination inhibition test. Am.J.vet.Res. 11, 226-230.
- SCHMITTLE, S.C., und T. MILLEN, 1948: Detection of haemagglutination inhibition antibodies in incubated eggs. Cornell.Vet. 38, 306-309.
- SCHNEIDER, B., 1954: Immunität und Antikörpergehalt bei gegen atypische Geflügelpest vaccinierten Hühnern. Eine orientierende Untersuchung zweier Immunisierungsmethoden. Vet.med. Nachr. Seite 65-83.
- SCHNEIDER, B., 1960: Untersuchungen zur Vaccination gegen die atypische Geflügelpest. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 73, 41-44.
- SCHNEIDER, B., und H.J. BENGELSDORFF, 1963a: Zur Kombinationsimpfung von Küken gegen Newcastle disease und Geflügelpocken. Berl. Münch.Tierärztl.Wschr. 76, 24-27.
- SCHNEIDER, B., und H.J. BENGELSDORFF, 1963b: Newcastle disease - Immunisierungsprogramme und Empfänglichkeit der Küken immuner Hennen. Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 76, 371-375.
- SCHNEIDER, J., 1964: Beobachtungen über die aviäre Encephalomyelitis (AE) der Hühner. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 321-324.
- SCHNEIDER, J., 1967: Beobachtungen über die Durchseuchung von Zuchthühnerbeständen nach Lebendvaccination mit dem Virus der Aviären Encephalomyelitis (AE). Arch.Geflügelk. 31, 342-348.

- SEREBRYAKOV, A.S., V.A. SHUBIN und Z. YA. CHISTOVA, 1969: Influence of *Mycoplasma gallisepticum* on the formation of immunity to Newcastle disease. *Veterinariya*, Moscow, 7, 45-47 (zit. nach *Vet. Bull.* 40, 110, 1970).
- SHIBLEY, G.P., R.L. LUGINBUHL und C.F. HELMBOLDT, 1962: A study of infectious laryngotracheitis virus. I. Comparison of serologic and immunogenic properties. *Avian.Dis.* 6, 59-71.
- SIEGMANN, O. und H. LODERS, 1970: Methodische Fragen der Therapie über das Trinkwasser. *Zbl.Vet.Med. B* 17, 147-149.
- SIEGMANN, O., E.F. KALETA und R.F. LEIMBECK, 1974: Resorption und Elimination NDV-spezifischer maternalen Antikörper sowie deren Bedeutung für Vakzinationen von Hühnerküken gegen die Newcastle Disease. *Zbl.Vet.Med. B*, im Druck
- SKUTAR, I.G., und K.K. MUNTJANU, 1971: (Untersuchungen der passiven Immunität bei Küken und deren Einfluß auf die postvakzinale Immunität bei der Anwendung der Vakzine "LaSota"). Aus: Ref. Z., Moskva, Zivotnovodstvo i Veter. (zit. nach *Landw. Zentralbl.* IV, 17, 1043, 1972).
- SOKKAR, I.M.H., 1966b: Evaluation of some methods used for vaccination of baby chicks against Newcastle disease. *Vet.med.J.Giza*, 13, 233-238 (zit. nach *Vet. Bull.* 38, 385, 1968).
- SPALATIN, J., 1953: Immunoprophylaxe der atypischen Geflügelpest in Jugoslawien. XV. *Internat.tierärztl.Kongreß*, Proc. Part. I, 246-251.
- STERZL, J., und A. M. SILVERSTEIN, 1967: Developmental aspects of immunity. *Advanc.Immunol.* 6, 337-459.
- STONE, H.D., und W.A. BONEY, 1968: Vaccination of congenitally-immune chicks against Newcastle disease. *Proc.Soc.exper.Biol.Med.* 128, 525-530.

- STUMPEL, M.E.M., 1962: Beproeving van een vaccin tegen pseudovogelpest, stam LaSota, onder praktijkomstandigheden. Tijdschr. Diergeneesk. 87, 894-907.
- STUMPEL, M.E.M., 1969: Onderzoekingen over de vorming van antibichamen en de duur de immuniteit bij infectieuze bronchitis van kippen. Tijdschr. Diergeneesk. 94, 235-241.
- SUGIMURA, T., K. KATOCKA und Z. NAGAISHI, 1971: Influence of congenital passive immunity on the response of chicks to Newcastle disease vaccination. Natn. Inst. Anim. Hlth. Q. Tokyo 10, 99-105.
- SUMNER, F.W., R.L. LUGINBUHL und E.L. JUNGHERR, 1957: Studies on Avian Encephalomyelitis II. Flock survey for embryo susceptibility to the virus. Am.J.vet.Res. 18, 720-723.
- SZAKMARY, G., 1961:(Wertbestimmung von Geflügelpockenvirus am Küken). Magy.Allatorv.Lap. 16, 260-264 (zit. nach Landw. Zbl. IV, 7, 2014, 1962).
- TAYLOR, J.R.E., 1960: The control of avian encephalomyelitis by application of susceptibility test and vaccination by the water procedure. Proc. 64th. Ann.Meeting, U.S.Livestock, Sanit. Ass., 221-222.
- TAYLOR, J.R.E., und E.R. SCHELLING, 1960: The distribution of Avian Encephalomyelitis in North America as indicated by an immunity test. Avian.Dis. 4, 122-133.
- TOTH, B. 1965: Neuropathogenic of some strains of Newcastle virus for day old chicks. Magy.Allatorv.Lap. 20, 152-155 (zit. nach Vet.Bull. 36, 152, 1966).
- TOTH, B., und P. MARKOVITS, 1964: Studies on the immunogenicity of Newcastle disease vaccine strains in growing chickens. Acta vet. Hung. 14, 339-345.

- TYRRELL, D.A.J., 1969: Some recent trends in vaccination against respiratory viruses. *Brit. Med. Bull.* 25, 165-171.
- UHR, J.W., und G. MÜLLER, 1968: Regulatory effect of antibody on the immune response. *Advanc. Immunol.* 8, 81-127.
- VASIC, N., D. ERCEGOVAC und B. VASIC, 1966: (Immunisierende Eigenschaften des NDV "Muktesvar", der auf einer Kultur embryonaler Fibroblasten von Küken gewachsen ist. 3. Mitteilung: Ein Beitrag zur Kenntnis der aktiven Immunität gegen Newcastle Disease bei Küken von immunen Muttertieren. *Veterin. Glasnik.*, Beograd 20, 603-608 (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 12, 2533, 1967).
- VIELITZ, E., und H. LANDGRAF, 1971: Wirksamer Schutz gegen Geflügelpest durch Trinkwasserimpfung. *Dt. Gefl. Wirt.* 23, 83.
- VOETEN, A.C., D.H.J. BRUNS und E. van WERVEN, 1965: Een praktijkonderzoek betreffende de pseudovogelpest enting in het entschema voor pluimvee. *Tijdschr. Diergeneesk.* 90, 1401-1411.
- WADSWORTH, J.G. und F. YOUNG, 1955: A comparison of two vaccination procedures for Newcastle disease. *Poultry Sci.* 34, 1454-1455.
- WAVEREN, G.M., van, u. D.M. ZUIJDAM, 1955: Vaccintie tege Pseudovogelpest (Newcastle disease) door het mengen entstoff door het drinkwater. *Tijdschr. Diergeneesk.* 80, 685-696.
- WERNER, H.J., H. LEFEVRE und H.J. RAETTIG, 1971: Biphasic occurrence of IgM-forming cells in the intestine after oral immunization. *Nature* 232, 119-120.
- WHITE, F.H., L.E. HANSON und J.O. ALBERTS, 1953: Studies on Newcastle Disease. Vaccination studies with Newcastle disease vaccine (intranasal type) in parentally immune and susceptible chicks. *Poultry Sci.* 32, 103-106.

- WINTERFIELD, R.W., C.L. GOLDMAN und E.H. SEADALE, 1957d: Newcastle disease immunization studies. IV. Vaccination of chicken with B1, F and LaSota strains of Newcastle disease virus administered through drinking water. Poultry Sci. 36, 1076-1088.
- WINTERFIELD, R.W., und E.H. SEADALE, 1956: Newcastle disease immunization studies. I. Viability of Newcastle disease virus administered as vaccine in the drinking water. Am.J.vet.Res. 17, 5-11.
- WINTERFIELD, R.W., und E.H. SEADALE, 1957a: Some factors influencing the immune response from administration of Newcastle disease vaccine through drinking water under laboratory and field conditions. Avian Dis. 1, 122-123.
- WINTERFIELD, R.W., und E.H. SEADALE, 1957b: Newcastle disease immunization studies II. The immune response of chickens vaccinated with B1 Newcastle disease virus administered through the drinking water. Poultry Sci. 36, 54-64.
- WINTERFIELD, R.W., und E.H. SEADALE, 1957c: Newcastle disease immunization studies. III. The immune response of chickens vaccinated at an early age with B1 Newcastle disease virus administered through the drinking water under field conditions. Poultry Sci. 36, 65-70.
- WITTMANN, G. 1958: Der Nachweis präzipitierender Antikörper bei der Hühnerpockeninfektion mit Hilfe des Agar-Diffusionsverfahrens. Zbl.Vet.Med. B 5, 769-775.
- WITTMANN, G., und A. MAYR, 1960: Experimentelle Untersuchungen über die Immunität bei Hühnerpocken unter besonderer Berücksichtigung der Schutzimpfung. Zbl.Bakt.Hyg., I. Abt. Orig. 177, 518-541.
- WOERNLE, H., 1968: Probleme der Impfungen gegen die Infektiöse Bronchitis des Huhnes. Tierärztl.Umsch. 23, 58-63.
- WYNOHRADNYK, V., M. PAPADOPOL, P. DINCULESCU, u.E.SASU, 1962: (Laboruntersuchungen über den immunisierenden Wert einiger abgeschwächter Stämme des Geflügelpestvirus). Lucrarile Inst. Cercetari Veterin. si Bioprep. Pasteur Bucuresti 1, 381-395 (zit. nach Landw. Zentralbl. IV, 11, 1493, 1966)

- YOSHIDA, I., M. OKA, F. SHIMIZU, N. YUASA und H. TSUBAHARA, 1971: Neutralizing antibody in the respiratory tract of chickens inoculated with Newcastle disease vaccines. National Institute of Animal Health Quarterly 11, 75-82 (zit. nach Vet.Bull., 42, 144, 1972).
- ZUBOCY, R.A., und L.S. AGEEVA, 1968: Izucenie immunobiologicekich sovjestv virusavakciny protiv pseudocumy ptic iz stamma "La-Sota". Materialy III Vesojuznoj veterin. virusol. konf., Moskva 1, 221-222.
- ZUFFA, A. und R. SKODA, 1958: (Vaccination gegen Newcastle-Krankheit I. Ober die Immunität nach Vaccination mit dem Stamm B1) Vet. Casopis 7, 211-226 (zit. nach Landw. Zbl. IV, 940, 1959)
- ZUIJDAM, D.M., 1953: Vaccination against Newcastle Disease. XV. Internat. Tierärztl. Kongreß, Proc. Part I 252-256.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c. A. Mayr möchte ich
für die Überlassung des Themas und für die
hilfreiche Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. K. Danner
und Herrn Prof.Dr. H. Mahnel für Anlei-
tung und freundschaftliche Hilfe.

Gleichzeitig danke ich auch der techni-
schen Assistentin Frau R. Brücher.

LEBENS LAUF

Am 24. April 1943 wurde ich, Hermann Karl Maria Gerbermann, als Sohn des Bauern Hermann Gerbermann und seiner Ehefrau Emilie, geb. Bisping, in Everswinkel geboren. Seit 16. Juni 1970 bin ich verheiratet und habe 2 Kinder.

Nach dem Besuch der Volksschule in Alverskirchen, des Gymnasium Johanneum in Ostbevern und des Städtischen Ratsgymnasium in Münster legte ich dort am 18.2.1965 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1965 begann ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München mit dem Studium der Veterinärmedizin. Dieses unterbrach ich für 18 Monate wegen Einberufung zum Wehrdienst. Nach einem Zwischensemester an der Tierärztlichen Hochschule Wien, schloß ich an der Münchener Universität am 5. Oktober 1971 das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Die vorliegende Arbeit begann ich im November 1971 am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München.

Seit Oktober 1973 bin ich an der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung in Oberschleißheim tätig.

